

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 <b>C12N 15/12, 5/10, 1/21, C12P          21/02, C07K 14/735, C12Q 1/68 //          (C12P 21/02, C12R 1:91)</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO95/27057</b>  (43) 国際公開日 1995年10月12日(12.10.95)
(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP95/00638</b> (22) 国際出願日 <b>1995年4月3日(03.04.95)</b>  (30) 優先権データ 特願平6/129487 1994年4月1日(01.04.94) JP 特願平6/222547 1994年8月24日(24.08.94) JP 特願平7/109927 1995年3月30日(30.03.95) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 森川 寛(MORIKAWA, Minoru)[JP/JP] 〒277 千葉県柏市南逆井3丁目5番2号 Chiba, (JP) 原田直樹(HARADA, Naoki)[JP/JP] 〒338 埼玉県浦和市栄和2丁目10番9号 Saitama, (JP)		(74) 代理人 弁理士 湯浅恭三, 外(YUASA, Kyoza et al.) 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG).  添付公開書類 <span style="float: right;">国際調査報告書</span>
(54) Title : GENE CODING FOR IgG-Fc-BINDING PROTEIN  (54) 発明の名称 IgG-Fc部結合タンパク質をコードする遺伝子 (57) Abstract <p>A gene coding for an IgG-Fc-binding protein; a recombinant vector containing the gene; a host cell transformed by the vector; a process for producing a recombinant protein by culturing the host cell; and a recombinant protein having an IgG-Fc-binding activity produced by the above process.</p>		

## (57) 要約

I g G F c 部結合タンパク質 (F c  $\gamma$  B P) をコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培養して得られる組換えタンパク質の製造方法、ならびに上記方法で得られる組換え I g G F c 部結合活性を示すタンパク質。

## 情報としての用途のみ

P C T に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に P C T 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	EF	フィンランド	LR	リベリア	DE	ドイツ
BB	バハマ	FR	フランス	LT	リトアニア	EC	ヨーロッパ共同体
BG	ブルガリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア
BY	ベラルーシ	GE	ジョージア	MD	モルドバ	KN	セントクリストファー・ネイビス
CA	カナダ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	NZ	ニュージーランド
CC	中央アフリカ共和国	GU	グアム	ML	マリ	TC	タークス・カイコス諸島
CH	スイス	HN	ホンジュラス	MN	モンゴル	GT	グアテマラ
CI	コートジボワール	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CM	カメルーン	IT	イタリア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	JP	日本	MX	メキシコ	VC	セントビンセント・グレナダ
CZ	チェコ	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	KR	大韓民国	NL	オランダ	US	米国
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	VG	ヴァージン諸島
		LI	リヒテンシュタイン	NZ	ニュージーランド		
				PL	ポーランド		
				PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## I g G F c 部結合タンパク質をコードする遺伝子

## 技術分野

本発明は免疫グロブリンG (I g G) のF c部分と特異的に結合するタンパク  
5 質であるI g G F c部結合タンパク質 (F c  $\gamma$  B P : F c  $\gamma$  B i n d i n g  
P r o t e i n およびI g G F c B P と記載することもある) をコードする遺伝  
子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換され  
た宿主細胞、該宿主細胞を培養して得られる組換えタンパク質の製造方法、なら  
びに上記方法で得られる組換えI g G F c部結合活性を示すタンパク質に関する。

10

## 背景技術

マクロファージは免疫担当細胞の1つとして、生体外から侵入してきた異物や  
そのイムノグロブリンG (I g G) 複合体を食食作用 (p h a g o c y t o s i  
15 s) により細胞内に取り込み、消化し、またリンパ球による抗体産生を誘起させ  
るために、抗原提示作用を示す能力も有する。このような食食機構の主たる入口  
がマクロファージの細胞表面上に存在するI g GのF cレセプター (F c  $\gamma$  レセ  
プター : F c  $\gamma$  R) である。F c  $\gamma$  レセプターはI g GのF c部を結合するレセ  
プターであるが、その本来の機能は、I g Gによっておおわれた (オプソニン化)  
20 病原体あるいは抗原-I g G免疫複合体を除去することにある。

従来F c  $\gamma$  レセプターには大別して3種類の存在が知られており、これらはR  
I、R I I、R I I Iと名付けられている (J. V. Ravetch and J. -P. Kinet, Annu. Rev. I  
m m u n o l. (1991), 9:457-492)。これらのレセプターはいずれもすでにそのc D N  
Aがクローニングされている。さらに、1990年~1991年にはいくつかの  
25 グループによって、これらF c  $\gamma$  レセプターに会合しており、F c  $\gamma$  レセプター  
がその結合物を内部に取り込むために必要な動きを始めるためのタンパク質が見  
いだされ、スイッチ機構の糸口が明らかにされた (L. L. Lanier, G. Yu and J. H. P  
hillips, Nature (1989), 342:803-805; T. Kurosaki and J. V. Ravetch, Nature

(1989), 342:805-807; D.G.Orioff, C.Ra, S.J.Frank, R.D.Klausner and J.-P. Kinet, Nature (1989), 347:189-191; P.Anderson, M.Caligiuri, C.O'Brien, T. Manley, J.Ritz and S.F.Schlossman, Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1990), 87:2274-2278; T.Kurosaki, I.Gander and J.V.Ravetch, Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1991), 88:3837-3841; L.Azzoni, M.Kamoun, T.W.Salcedo, P.Kanakaraj and B.Petrussia, J.Exp.Med. (1992), 176:1745-1750; A.T.Ting, L.M.Karnitz, R.A.Schoon, R.T.Abraham and P.J.Leibson, J.Exp.Med. (1992), 176:1751-1755)。

一方、小林らはヒト小腸および大腸上皮細胞、特にゴブレット細胞にIgGのFc部と特異的に結合でき、かつ従来のFcγレセプターとは異なるタンパク質FcγBPの存在を報告した。このタンパク質のIgGFc部との特異的結合はホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識物を用いて確認されている。すなわち、FcγBPはIgGのFc部とのみ結合し、IgGFab、IgA、IgMとは結合しない。またFcγBPはFcγレセプターI、II、III抗体と交差反応しない(K.Kobayashi, M.J.Blaser and W.R.Brown, J.Immunol. (1989), 143:2567-2574)。

さらに、彼らはFcγBPをヒト大腸上皮細胞から部分精製し、これを抗原としてマウスモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体とFcγBPが結合するだけでなく、マウスIgGとも結合することが確認された(K.Kobayashi, Y.Hamada, M.J.Blaser and W.R.Brown, J.Immunol. (1991), 146:68-74)。

また、部分精製FcγBPをドデシル硫酸ナトリウム(SDS)電気泳動した後、モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析に付したところ、FcγBPは分子量78kDaのタンパク質を含む200kDa以上の会合体を形成していることが明らかとなった(K.Kobayashi, Y.Hamada, M.J.Blaser and W.R.Brown, J.Immunol. (1991), 146:68-74)。

上記FcγBPはIgGのFc部と結合できるという点においてはFcγレセプターと同様の性質を示す。しかしながら、FcγBPのタンパク質としての安定性、構造およびその生体内の役割については何ら明らかではなかった。したがって、FcγBPを解析し、その構造と機能を明らかにすることは極めて興味深い。



- さらに後述するように、Fc $\gamma$ BPは粘液とともに粘膜上に分泌され、IgG抗体とともに、体内に侵入しようとする病原菌やウイルスなどを粘液中にトラップし、体外に排泄し易くすることで、感染防御の一端をになっていると推定される。また、炎症の起こった粘膜で過剰に産生された自己抗体は、補体系を活性化したり、マクロファージなどによる細胞障害を起こさせたりして、炎症の悪化につながるが、Fc $\gamma$ BPはこのような自己抗体のFc部をブロックして炎症の進展を防ぐと推定される。このようなFc $\gamma$ BPの機能から感染防御剤、および潰瘍性大腸炎やクローン病などの自己免疫疾患に対する抗（消）炎症剤や診断薬などの医薬用途に利用できる可能性を有している。
- そこでFc $\gamma$ BPをこのような医薬用途に用いるにはこれを大量にかつ均一に得る必要があった。しかしながら、Fc $\gamma$ BPを動物組織自体、またはその産生細胞の培養上清から単離する方法では大量に均一なFc $\gamma$ BPを得ることは困難であった。したがって、遺伝子組換え技術を用いてFc $\gamma$ BPを大量に製造することが望まれていた。
- 本発明者らは、Fc $\gamma$ BPに対するモノクローナル抗体を用いてFc $\gamma$ BPのcDNAのクローニングを行って、Fc $\gamma$ BPをコードする遺伝子の塩基配列を明らかにすることに成功した。
- また、このcDNAを適当なベクターに挿入して得られる発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養し、次いで産生された目的タンパク質を分離、精製したところ、産生タンパク質はヒトIgGと特異的に結合する性質を有していた。これによりFc $\gamma$ BPを大量かつ均一に製造することができるとも明らかにした。

#### 発明の開示

- したがって、本発明はFc $\gamma$ BPをコードする遺伝子を提供する。
- 本発明はまた、Fc $\gamma$ BPをコードする遺伝子を含む組換えベクターを提供する。
- 本発明はさらに、Fc $\gamma$ BPをコードする遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された原核もしくは真核宿主細胞を提供する。

本発明はさらに、Fc $\gamma$ BPをコードする遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換して得られた形質転換体を培養し、産生された目的タンパク質を分離、精製することを特徴とする、Fc $\gamma$ BPの製造方法を提供する。

本発明はさらに、上記製造方法で製造されたIgGFc部結合活性を示すタンパク質を提供する。

本発明はさらに、Fc $\gamma$ BPをコードする遺伝子またはその一部を、Fc $\gamma$ BP mRNAの合成組織を同定するためのノーザンブロット解析法またはインサイチュハイブリダイゼーション法のプローブとして使用する方法を提供する。

#### 10 図面の簡単な説明

図1は、プローブQを用いて行ったFc $\gamma$ BP mRNAのハイブリダイゼーションの結果を示す図（電気泳動の写真）である。

図2は、Fc $\gamma$ BPの発現に用いた部分cDNA（約7.8 kbp）、ならびにクローンNZ4、C72、Y1、X1およびV11の相互の関係を示す。

15 図3は、ベクターpNV11-SRを用いて形質転換したCOS7細胞の発現するタンパク質を確認する図（生物の形態を示す写真）である。一次抗体として、AはK9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清、BはK17モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清を用いた。Cは一次抗体を加えない対照。いずれのものにも二次抗体としてHRP結合ヤギ抗マウスIgG（H+L）F

20 (ab')<sub>2</sub>フラグメントを加えた。

図4は、ベクターpNV11-SRを用いて形質転換したCOS7細胞の発現するタンパク質のヒトIgG結合能を示す図（生物の形態を示す写真）である。いずれのものにも一次抗体としてHRP結合ヒトIgGを用いた。拮抗剤として用いた二次抗体は以下の通り；A：加えず（対照）、B：クロマトグラフィー精製ヒトIgG画分、C：クロマトグラフィー精製ヒトIgG Fc画分。

25 図5は、ベクターpNV11-SRを用いて形質転換したCOS7細胞の発現するタンパク質のヒトIgG結合能を示す図（生物の形態を示す写真）である。いずれのものにも一次抗体としてHRP結合ヒトIgGを用いた。拮抗剤として用いた二次抗体は以下の通り；D：クロマトグラフィー精製ヒトIgG Fc (a

b')<sub>2</sub>画分、E:クロマトグラフィー精製ヒトIgM画分、F:クロマトグラフィー精製ヒト血清IgA、G:クロマトグラフィー精製ヒト分泌型IgA。

図6は、FcγBP mRNAのヒト組織での発現の特異性を示すノーザンブロットの図(電気泳動の写真)である。

- 5 図7は、プローブQ、AおよびYを用いて実施した大腸粘膜上皮細胞中のFcγBP mRNAのノーザンブロット解析を示す図(電気泳動の写真)である。

図8は、FcγBPの全長cDNAの構造を示す図である。

- 図9は、プラスミドpiF-A53およびpiF-A8を用いて形質転換したCOS7細胞とモノクローナル抗体K9/K17混液との結合能を示す図(生物の形態を示す写真)である。A:piF-A53、B:piF-A8。

図10は、FcγBPのエキソン/イントロン境界領域の塩基配列の比較を示す図である。大文字(ボックス)はエキソン、小文字はイントロンを示す。また下線部は高度に保存された配列を示す。R:プリン、y:ピリミジン。

- 図11は、FcγBPゲノムDNAの5'側翻訳開始部位近傍の塩基配列を示す図である。大文字はエキソン、小文字はイントロンを示す。下線で示した部分はcDNAと同一の部分を、またshadeされた太文字はin frameでのTGAストップコドンおよび翻訳開始部位と推定されるATGコドンを示す。なお、数字はcDNAクローンNZ4の5'末端を+1とし、エキソンの上にのみ番号を付けた。

- 20 図12は、ヒトFcγBPの構造と、本発明で用いた各クローンの対応する位置を示す。

- 図13は、FcγBPフラグメントを発現するCHO細胞を示す(生物の形態を示す写真)。(A)はメトトレキセート6.4μM、ナトリウムブチレート非処理；(B)はメトトレキセート6.4μM、5mM ナトリウムブチレート処理後を示す。

#### 発明の詳細な説明

FcγBPをコードするcDNAは、例えばFcγBPを産生する細胞などからmRNAを調製した後、既知の方法により二本鎖cDNAに変換することによ

り得られる。mRNAの供給源としては、本発明ではヒト大腸粘膜上皮細胞を用いたが、これに限らず、ヒト小腸、十二指腸、胃、顎下腺、舌下腺、総胆管、気管支などのFc $\gamma$ BPが分布している組織のホモジェネートなどを用いてもよい。また、ヒト大腸癌細胞由来HT29-18-N2株およびその亜種はFc $\gamma$ BPを産生していることが知られているので、これらの株化細胞をmRNAの供給源として用いてもよい。

mRNAを調製するには、例えば本発明で用いたように、AGPC法(P. Chomczynski et al. Analytical Biochem. 162:156-159, 1987)の改変法その他、Chirgwinら(Biochemistry 18:5294-5299, 1979)の方法にしたがって、全RNAを調製できる。また、他の生理活性タンパク質の遺伝子をクローン化するとき用いられた方法、例えばバナジウム複合体などのリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行うことによっても実施することができる

こうして得られたmRNAから二本鎖cDNAを得るには、例えばmRNAを鋳型にして、3'末端にあるポリA鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマー、あるいはFc $\gamma$ BPのアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写反応を行い、mRNAに相補的なDNA(cDNA)を合成する。

本発明では、Gubler & Hoffmanの改良法を用いて、Amersham社製またはIn Vitrogen社製のcDNA合成キットとランダムプライマーを用いて、ポリアデニル化RNAから逆転写反応によりcDNAを作製した。

このcDNAにアダプターを連結させた後、 $\lambda$ gt11ベクターのEcoRI部位に挿入した。このようにして作製したcDNAライブラリーを、Stratagene社のファージin vitroパッケージングキットGigapack II Goldを用いて、 $\lambda$ ファージにパッケージングした後大腸菌に発現させた。発現したcDNAのタンパク質をモノクローナル抗体をプローブとしてスクリーニングを行った。

上記クローニングに用いる抗体は、IgGFcとFc $\gamma$ BPとの間の結合を阻

害する3種類のモノクローナル抗体(K9、K10、K17) (Kobayashi et al. J. Immunology 146:68-74, 1991; Kobayashi et al. J. Immunology 143:2567-2574, 1989)の中から、ウェスタンブロット解析においてFc $\gamma$ BPを検出できる抗体を選択した。すなわち、非還元条件下ではK9抗体で分子量約200 kDaより大きいバンドが、還元条件下ではK17抗体で70-80 kDaと130-140 kDaにバンドがそれぞれ認められた。以上の結果より、クローニングにはこの2種の異なるエпитープを認識するモノクローナル抗体を用いた。

このスクリーニングの結果、K9抗体では、約100万個のクローンより1個のクローン(プローブQと命名: 600 bp)を、またK17抗体では、約60万個のクローンより7個のクローン(そのうちの700 bpのDNA断片をプローブAと命名: 600 bpのDNA断片をプローブBと命名)を得た。

プローブQを用いて既知タンパク質のmRNAと比較することによって、Fc $\gamma$ BP mRNAのサイズを推定した。その結果、Fc $\gamma$ BP mRNAの分子サイズは約17 kbpであると推定された(図1)。

次いでプローブQ、AおよびBを用いて $\lambda$ gt10にパッケージングした第2 cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。まずプローブA、BまたはQのいずれかとハイブリダイズするcDNAクローンを分離した。これらのうちから、Aとのみハイブリダイズするクローンを得て、Aとは反対側の末端部をプローブXとして、プローブX(約700 bp)とハイブリダイズするcDNAクローンを分離した。得られたクローンはXを中心部にし、一端にA-B領域をもっており、これをX1と命名した。続いて、クローンX1のA-B領域とは反対側の部分約800 bpをプローブYとして、再びcDNAライブラリーをスクリーニングし、プローブYとハイブリダイズするcDNAクローンを得た。このクローンをY1と命名した。クローンY1は一端にX領域の一部を有し、中心部にY領域を有する。このクローンY1のX領域とは反対側の端にある約150 bpをプローブY150とした。再びcDNAライブラリーをプローブY150を用いてスクリーニングした。この中からY150領域と反対側に最も長く伸びたクローンを選び、クローンC72とした。次に、クローンC72がもつY150領域とは反対側の端近くにある約450 bpをプローブZとし、プローブZとハイブ

リダイズする cDNA クローンを分離した。これらの中からクローン C72 と重複しない部分ができるだけ長いものを分離し、クローン NZ4 とした。

一方、A、B および Q のいずれともハイブリダイズする cDNA クローンの中から、A-B 領域の塩基配列がクローン X1 の A-B 領域の塩基配列と同一のも  
5 のを選び出し、これをクローン V11 とした。

以上の 5 個のクローン、X1、Y1、C72、NZ4 および V11 の塩基配列を決定し、タンパク質のアミノ酸配列を確認したところ、ATG を開始コドンとする 1 本のオープンリーディングフレームを見いだした (図 2 参照)。

さらに、これらのクローンから FcγBP をコードする部分 cDNA (約 7.  
10 8 kbp) を得て、その塩基配列を決定した (配列番号 6 に塩基配列およびアミノ酸配列を示す)。

さらに、上記プローブ A、B または Q を用いたハイブリダイゼーションによるスクリーニングで得られた複数の cDNA クローンをそれぞれ大腸菌内で増幅した後、プローブ A、B、Q を用いてマッピングを行った。その結果、FcγBP  
15 の cDNA は全長 16.4 kbp の中に 3.5 kbp をユニットとする単位 (プローブ A、B、Q のそれぞれと相同な配列が A→B→Q の順に連なった単位) がタンデムに複数回繰り返した構造を有することが推定された。

そこでプローブ B とハイブリダイズする cDNA クローンについて、プローブの塩基配列の一部を PCR により増幅させ、得られたフラグメントの塩基配列を  
20 解析することにより、FcγBP の全長 cDNA は図 8 に示す構造を有し、配列表の配列番号 7 に示す塩基配列とアミノ酸配列を有することが明らかとなった。

このようにして得られたクローン化された FcγBP をコードする遺伝子は適当なベクターに組み込むことにより、原核細胞または真核細胞の宿主細胞を形質転換することができる。

25 さらに、これらのベクターに適当なプロモーターや形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質として発現させ、精製を容易にしたり、発現量を上げたり、また精製工程において適当な処理を施すことにより、目的タンパク質を切り出す

ことも可能である。

一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように、多形現象を示すと考えられ、この多形現象によって1個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

また、配列表の配列番号6または7あるいはその一部に示すアミノ酸配列中の1個またはそれ以上のアミノ酸を欠くかまたは付加したポリペプチド、あるいはアミノ酸が1個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでもIgGFcへの結合性を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン2(IL-2)遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する塩基配列に変換して得られたポリペプチドがIL-2活性を保持することも既に公知になっている(Wang et al., Science 224:1431, 1984)。

また、真核細胞で発現させた場合、その多くは糖鎖が付加されるが、アミノ酸を1個ないしそれ以上変換することにより糖鎖付加を調節することができるが、この場合でもIgGFc部結合活性を有することがある。それゆえ、本発明におけるFcγBPの遺伝子を人工的に改変したものを用いて、得られたポリペプチドがIgGFc部結合活性を有する限り、それらのポリペプチドをコードする遺伝子はすべて本発明に含まれる。

さらに、得られたポリペプチドがIgGFc部結合活性を有し、配列番号6または7あるいはその一部に示す遺伝子とハイブリダイズする遺伝子も本発明に含まれる。なお、ハイブリダイゼーション条件は、通常行われているプローブハイブリダイゼーションの条件を適用することができる(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

以上のように、免疫グロブリンG(IgG)のFc部分と特異的に結合するタンパク質を発現できるDNAであれば、配列表の配列番号6または7に示すアミノ酸をコードする塩基配列に限らず、種々の修飾体のDNAが本発明に含まれるし、またその機能を有するDNA断片も本発明の遺伝子の一部であることは明白である。

本発明の発現ベクターは、複製起源、選択マーカー、プロモーター、RNA スプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどを含む。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌などが挙げられる。また、真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞として、例えばイースト、粘菌が挙げられる。あるいは、Sf9などの昆虫細胞を宿主細胞として使用してもよい。さらに、動物細胞由来の宿主細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、C127細胞および3T3細胞などが挙げられる。

以上のようにして目的とするFc $\gamma$ BPをコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生されたIgGFc部結合活性を有するタンパク質は細胞内または細胞外から分離し、精製することができる。

なお、本発明の目的タンパク質であるIgGFc部結合活性を有するタンパク質の分離、精製には実施例に記載する方法に限定されることなく、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用することができる。例えば、各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析などを適宜選択、組み合わせて使用することができる。

かくして得られた組換えタンパク質が天然型Fc $\gamma$ BPと同様のヒトIgGとの結合活性を有するかを検討したところ、ヒトIgGFcと特異的に結合することが明らかとなった。

上記したように、本発明のFc $\gamma$ BPの全長cDNAは図8に示す構造を有し、配列表の配列番号7に示す塩基配列とアミノ酸配列を有するものであるが、さらに本発明で用いた一連のcDNAが単一のmRNAに由来するものであることを以下のようにして再確認した。すなわち、発現に用いた5'末端cDNAを含むpNV11SRとは別のリピート構造内のcDNA断片をタンパク質発現させ、Fc $\gamma$ BPを認識するモノクローナル抗体であるK9およびK17と反応させたところ、これらのcDNA産物がK9とK17のいずれかまたは両方により認識されることを確認した。

さらに、Fc $\gamma$ BPのmRNAの発現の組織特異性を試験したところ、ヒト胎盤における発現が確認された。したがって、本発明のFc $\gamma$ BPをコードする遺



伝子またはその一部をプローブとして用いて、ノーザンブロット解析またはインサイチュハイブリダイゼーションによってFc $\gamma$ BP mRNAの合成組織を同定することができる。

- 5 さらに、Fc $\gamma$ BPの染色体遺伝子上の多型性の存在を制限酵素の利用により示し得た。

本発明のFc $\gamma$ BPをコードする遺伝子を得る方法、該遺伝子を有する組換えベクターおよびこれを含有する形質転換体ならびに該形質転換体を培養して得られる目的タンパク質、ならびにそれぞれの製造方法について、以下の実施例で詳細に説明するが、この実施例によって本発明が限定されるものではない。

10

#### 実施例

実施例1：モノクローナル抗体を用いたFc $\gamma$ BPをコードする部分cDNAのクローニング（A：cDNAライブラリーの作製）

##### （1）ヒト大腸粘膜上皮細胞の調製

- 15 ヒト大腸組織片を10%FBSを含むRPMI培地でよく洗浄した後、粘膜筋板の部位から機械的に剥離させ、上皮細胞と粘膜固有層を分離した。これを中心棒に固定するようにして、10%FBS/5mM EDTA/PBS（－）中で氷冷しながら90分間スターラーで激しく攪拌し、上皮細胞を分離した。上皮細胞を含む溶液を1500rpmで10分間遠心し、細胞の沈殿を得た。

- 20 （2）mRNAの精製

- 粘膜上皮細胞からの全RNAの抽出はAGPC法（P. Chomczynski et al., Analytical Biochem., (1987) 162:156-159）を改変して行った。すなわち、細胞ペレット1mlに対し、9mlの変性溶液（4Mチオシアン酸グアニジン、25mMクエン酸ナトリウム（pH7）、0.5%サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール）を加え、細胞を溶解した後、1mlの2M酢酸ナトリウム（pH4）、10mlの水飽和フェノール溶液、2mlのクロロホルム/イソアミルアルコール（49：1）を順次加えた。10秒間攪拌し、15分間氷冷した後、10,000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清8mlに対し、同様に0.8mlの酢酸ナトリウム、8mlの水飽和フェノール、1.6mlの

- クロロホルム／イソアミルアルコールを加え、10秒攪拌、15分氷冷、10,000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清7mlに対し、等量のクロロホルム／イソアミルアルコールを加え攪拌後、遠心分離により上清を得た。上清に対し、等量のイソプロパノールを加え、-20℃で30分間冷却後、10,000×gで15分間遠心し、全RNAの沈殿を回収した。

- 全RNA 1mgの溶液に溶出バッファー(10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.1% SDS)を加え、全量で1mlとした後、OligoTex-dT30<Super>(宝酒造社製) 1mlを加え、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。5M NaCl 0.2mlを加え、37℃で10分間保温した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを洗浄バッファー(10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.5M NaCl、0.1% SDS) 2.5mlに懸濁した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを滅菌水1mlに懸濁し、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。15,000rpmで3分間遠心分離した後、上清を回収した。50μlの5M NaClと2.5mlのエタノールを加えた後、-20℃で30分冷却し、遠心(3,000rpm、4℃)して、ポリアデニル化RNAの沈殿を回収した。

### (3) cDNAの合成

- mRNAからのcDNAの合成は、GublerおよびHoffman (U. Gubler and B. J. Hoffman (1983) Gene 25:263) の改良法により、Amersham社製またはInvitrogen社製のcDNA合成キットを用いて行った。すなわち、大腸粘膜上皮細胞より調製したポリアデニル化RNA 5μgを42℃にて90分間、50ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター、1mM dATP、1mM dGTP、1mM dCTP、0.5mM dTTP、1000ユニットのAMV逆転写酵素、ピロリン酸ナトリウムを含む緩衝液(Amersham社製) 50μl中で、750ngのランダムヘキサヌクレオチドまたは4μgのオリゴ(dT)プライマーと共にインキュベートした。この反応液50μlを4.0ユニットの大腸菌リボヌクレアーゼH、115ユニットの大腸菌

DNAポリメラーゼIを含む緩衝液(Amersham社製)中で、12℃で60分間、次いで22℃で60分間反応させた後、70℃で10分間インキュベートした。氷中に戻し、10ユニットのT4 DNAポリメラーゼを加え、37℃で10分間反応させた後、10 $\mu$ lの0.25M EDTA(pH8)を加えて  
5 反応を停止させた。反応液250 $\mu$ lに対し、等量の7.5M酢酸アンモニウムと、4倍量のエタノールを加え、攪拌後、-20℃にて30分間冷却し、遠心分離によりcDNAを回収した。cDNAを10 $\mu$ lの滅菌水に溶かし、1 $\mu$ lを用いて0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、合成の確認と濃度の定量を行った。

10 (4) アダプターの連結

上記(3)で得た合成cDNAに対して10倍量のモル比となるようにアダプター(EcoRI-NotI-BamHIアダプター、宝酒造社製)を加え、全体量の8倍量のライゲーション溶液A(ライゲーションキット、宝酒造社製)と1倍量のライゲーション溶液B(ライゲーションキット、宝酒造社製)を加えた。  
15 十分攪拌した後、16℃で30分間インキュベートし、アダプターをcDNAへ連結させた。

この反応液をTAE緩衝液系で1%の低融点アガロースゲル(Sea Plaqueアガロース、宝酒造社製)で電気泳動を行い、0.5kbp以上のcDNA画分を含むゲルを回収した。この操作により、cDNAに結合しなかったアダプターも同時に除いた。回収したゲルの湿重量に対し、2倍量のTE緩衝液を加え、65℃で10分間保温し、アガロースゲルを溶解した後、全体量に対し等量のトリス飽和フェノールを加え、十分に攪拌後、氷冷した。遠心分離により水相を回収し、等量のトリス飽和フェノール処理を再び行った。遠心分離により水相を回収し、最後に等量のクロロホルムを加え、十分攪拌後遠心分離した。その後、  
25 水相を回収し、1/10量の3M酢酸ナトリウム、20 $\mu$ gのグリコーゲン(ベーリンガーマンハイム社製)、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で30分間冷却した後、15,000rpmで10分間4℃で遠心し、cDNAの沈殿を得た。

(5)  $\lambda$ gt11ライブラリーの作製

上記(4)で得たアダプターを連結したcDNAを96 $\mu$ lの500mM Tris-HCl (pH7.5)、100mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、10mM ATPからなる溶液に溶解し、40ユニットのポリヌクレオチドキナーゼを加え、37℃で60分間インキュベーションし、アダプターの5'末端をリン酸化した。反応終了後、200 $\mu$ lのTE緩衝液を加え、300 $\mu$ lのトリス飽和フェノールを加え、攪拌後、遠心分離(15,000rpm、室温、2分間)により上清を回収した。同様の遠心分離処理をトリス飽和フェノール・クロロホルム(1:1)溶液、続いて2%イソアミルアルコールを含むクロロホルム溶液によって行い、最終的に250 $\mu$ lの上清を得た。この上清に250 $\mu$ lの4M酢酸アンモニウム溶液、1250 $\mu$ lのエタノールを加え、-20℃、30分間冷却後、遠心分離(15,000rpm、4℃、10分間)により沈殿を回収した。cDNAの沈殿に1 $\mu$ gのEcoRI消化脱リン酸 $\lambda$ gt11アーム(#234211、Stratagene社製)を加え、終濃度100mM Tris-HCl (pH7.6)、5mM MgCl<sub>2</sub>、300mM NaClの溶液5 $\mu$ lに溶解した。ライゲーション溶液B (DNAライゲーションキット、宝酒造社製)を5 $\mu$ l加え、十分攪拌した後、26℃で10分間反応させた。cDNAを $\lambda$ ファージにパッケージするために、cDNAを含むライゲーション反応液4 $\mu$ lを、10 $\mu$ lのFreeze/Thaw抽出液(GigapackII gold、Stratagene社製)に加え、直ちにSonic抽出液(GigapackII gold)を加え、ゆっくり攪拌した。22℃にて2時間インキュベーションした後、500 $\mu$ lのファージ希釈用溶液(5g NaCl、2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、50ml 1M Tris-HCl (pH7.5)、5ml 2%ゼラチン/リットル)と、10 $\mu$ lのクロロホルムを加え、インビトロパッケージング反応を終了した。このファージ溶液は4℃に保存し、スクリーニングに用いた。

実施例2：モノクローナル抗体を用いたFc $\gamma$ BPをコードする部分cDNAのクローニング(B：抗体を用いたcDNAライブラリーのスクリーニング)

(1)スクリーニング

実施例1で作製した、 $\lambda$ ファージにパッケージングをした大腸粘膜上皮細胞の cDNAライブラリーの  $1 \times 10^4$  p f u、 $200 \mu$  l を、一晚培養した大腸菌株 Y10907-  $200 \mu$  l と混ぜ合わせ、 $37^\circ\text{C}$  で15分間インキュベーションした。LB培地を混合した0.8%トッパアガロースを溶解した後、 $55^\circ\text{C}$  に  
5 保温したもの5mlをファージと大腸菌のブレインキュベーション液に加えて混ぜ合わせ、1.5% LBアガロースプレート ( $10 \times 14$  cm) 上に均一に広げた。 $42^\circ\text{C}$  のインキュベーター中にて3.5時間保温し、小さなプラークが確認された後、あらかじめ10mM IPTGをしみこませた後風乾させておいた  
10 ナイロン強化ニトロセルロースフィルター (#BA-S85、Schleicher & Schnell社製) を重ね、 $37^\circ\text{C}$  にて3.5時間保温した。フィルターをプレートからはがし、洗浄液 (0.05% Tween-20、25mM Tris-HCl (pH7.5)、150mM NaCl、3mM KCl) 中、室温で30分間振とうした。次に、5%スキムミルクを含むPBS (-) 中、室温で30分間振とうし、ブロッキング処理を行った後、洗浄液にて20分間、  
15 2回洗浄した。次いで、大腸粘膜上皮細胞中のFc $\gamma$ BPに対して作製されたマウスモノクローナル抗体 (Kobayashi et al., J. Immunology (1991) 146:68-74 ; Kobayashi et al., J. Immunology (1989) 143:2567-2574) であるK9またはK17を含むハイブリドーマ培養上清を、ニトロセルロース膜1枚に対し5mlに浸し、室温で2時間振とうした後、洗浄液で20分間、2回洗浄した。洗浄液  
20 にて1/1000倍に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗マウスIgG (H+L) ヤギ抗血清 (ザイメット社製) 中、室温で1時間振とうした後、洗浄液で20分間、2回洗浄した。Tween-20を含まないTBS溶液で10分間洗浄した後、50mlのジアミノベンチジン溶液 (1mg/ml 0.1M Tris-HCl (pH7.2)) と、50mlの0.02  
25 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液と50 $\mu$  lの8%  $\text{NiCl}_2$  溶液の混合液に浸し、陽性プラークの検出を行った。

## (2) $\lambda$ DNAの抽出

K9モノクローナル抗体を用いたスクリーニングにより、約100万個のプラーク中から1個の約600塩基対の挿入cDNAを含むクローンを得た。このプ

ラークをつまようじでピックアップして、200  $\mu$ l の培地 (20 mM MgSO<sub>4</sub>、0.2% マルトース、5  $\mu$ l の Y1090  $\gamma^-$  大腸菌株の一晩培養懸濁液を含む LB 培地) で、 $\lambda$  ファージを 37°C、4 時間培養した。このファージを含む培養液 2  $\mu$ l ( $1 \times 10^7$  pfu/ $\mu$ l) を、10 ml LB 培地 (20 mM MgSO<sub>4</sub> と 0.25 ml の Y1090  $\gamma^-$  大腸菌株の一晩培養懸濁液を含む) に添加、感染させ、37°C、5 時間振とう培養し、 $\lambda$  ファージを増殖させた。

5~6 時間培養後、溶菌を確認してから、50  $\mu$ l のクロロホルム、2 ml の 5M NaCl を加え、37°C、10 分間振とうした。3,500 rpm、15 分間遠心した上清に対して 10% となるようポリエチレングリコール 6000 を加え、氷上で 30~60 分置いた後、4°C、4,000 rpm で 15 分間遠心分離し、ファージを沈殿させた。沈殿を 1 ml の A 緩衝液 (0.5% NP-40、30 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、125 mM KCl、3.6 mM CaCl<sub>2</sub>、0.5 mM EDTA、0.25% デオキシコール酸ナトリウム、60 mM 2-メルカプトエタノール) に懸濁し、100  $\mu$ g/ml RNase A、20  $\mu$ g/ml DNase I と共に 37°C、30 分間インキュベートした。A 緩衝液と等量のクロロホルムを加え、攪拌後、15,000 rpm、2 分間、室温で遠心分離し、上清を回収した。再び同量のクロロホルムを加えて同様に遠心分離して上清を回収した。その後、上清液に 50 mM Tris-HCl (pH 8)、20 mM EDTA、0.5% SDS、100  $\mu$ g/ml プロテアーゼ K となるようにそれぞれ添加し、55°C、60 分間インキュベートした。 $\lambda$  DNA を精製するため、定法通り順次フェノール処理、フェノール/クロロホルム処理、クロロホルム処理を行い、DNAase、プロテアーゼなどを失活させた後、1/20 量の 5M NaCl と 1 倍量のイソプロパノールを加え、cDNA フラグメントが挿入された  $\lambda$  DNA の沈殿を得た。

### 25 (3) プロブ DNA の作製

上記 (2) で精製した cDNA フラグメントを含む  $\lambda$  DNA から BamHI 制限酵素部位を用いて挿入 DNA を切り出し、第 2 cDNA ライブラリーのスクリーニングのためのプロブ (これをプロブ Q と命名した) とした。

同様の方法で、K17 モノクローナル抗体を用いて得られた 7 個の  $\lambda$  クローン

のうち最長の挿入部（約1300塩基）をもつクローンよりBamHIによって切り出される700塩基と600塩基のDNAプローブを得た。このうちK17抗体のエピトープをコードするcDNAを含むと推定される700塩基のDNA断片をプローブA、600塩基の断片をプローブBとし、第2cDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。

#### （4）ノーザンブロッティング

抗体によるスクリーニングによって得られたA、Qの各プローブが同一のmRNAとハイブリダイズすることをノーザンブロットにより確認した。

大腸粘膜上皮細胞よりAGPC法により抽出した全RNA15 $\mu$ gを4.5 $\mu$ lの滅菌水に溶かした後、2 $\mu$ lの5 $\times$ MOPS緩衝液、3.5 $\mu$ lのホルムアルデヒド、10 $\mu$ lのホルムアミドと混合し、60 $^{\circ}$ C、15分間熱変性した後、ホルムアルデヒド存在下で1%アガロースゲル上で電気泳動した。電気泳動終了後、RNAをナイロン膜（バイオダイナA、ポール社製）へキャピラリー法にて一晩トランスファーを行った。UV架橋によりRNAをナイロン膜に固定した後、10mlのハイブリダイゼーション溶液（5 $\times$ SSPE、5 $\times$ Denhardt's溶液、50%ホルムアミド、0.5% SDS、100 $\mu$ g/ml熱変性サケ精子DNA）中にて42 $^{\circ}$ C、8時間、プレハイブリダイゼーションを行った。

次に抗体スクリーニングにより得られたプローブAおよびQを各々、 $\alpha$  [ $^{32}$ P] dCTPを用い、メガプライムラベリングキット（Amersham社製）によって放射性標識した。各プローブ $1 \times 10^8$  dpmを各々、5mlのハイブリダイゼーション溶液と共にプレハイブリダイゼーション処理したナイロン膜に加え、密封した後、42 $^{\circ}$ C、一晩ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜の洗浄は0.2 $\times$ SSC、0.2% SDSを含む溶液中で、65 $^{\circ}$ C、40分間の洗浄操作を3回繰り返し行った。ナイロン膜を乾燥後、X線フィルムに一晩露光した。

25

以上の方法より、プローブAおよびQを用いて推定約17kbpのバンドが一本それぞれ検出され、2種類のプローブが分子量的に同一のmRNAとハイブリダイズすることを確認した。

実施例3:FcγBPをコードするcDNAの第2のクローニング(A:cDNAライブラリーの作製)

(1) ヒト大腸粘膜上皮細胞の調製

- ヒト大腸組織片を10%FBSを含むRPMI培地でよく洗浄した後、粘膜筋板の部位から機械的に剥離させ、上皮細胞と粘膜固有層を分離した。これを中心棒に固定するようにして、10%FBS/5mM EDTA/PBS(-)中で氷冷しながら90分間スターラーで激しく攪拌し、上皮細胞を分離した。上皮細胞を含む溶液を1500rpmで10分間遠心し、細胞の沈殿を得た。

(2) mRNAの精製

- 10 粘膜上皮細胞からの全RNAの抽出はAGPC法(P. Chomczynski et al., Analytical Biochem., (1987) 162:156-159)を改変して行った。すなわち、細胞ペレット1mlに対し、9mlの変性溶液(4Mチオシアン酸グアニジン、25mMクエン酸ナトリウム(pH7)、0.5%サルコシル、0.1M 2-メルカプトエタノール)を加え、細胞を溶解した後、1mlの2M酢酸ナトリウム
- 15 (pH4)、10mlの水飽和フェノール溶液、2mlのクロロホルム/イソアミルアルコール(49:1)を順次加えた。10秒間攪拌し、15分間氷冷した後、10,000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清8mlに対し、同様に0.8mlの酢酸ナトリウム、8mlの水飽和フェノール、1.6mlのクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、10秒攪拌、15分氷冷、10,
- 20 000×gで15分間遠心し、上清を回収した。上清7mlに対し、等量のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え攪拌後、遠心分離により上清を得た。上清に対し、等量のイソプロパノールを加え、-20℃で30分間冷却後、10,000×gで15分間遠心し、全RNAの沈殿を回収した。

- 全RNA1mgの溶液に溶出バッファー(10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTA、0.1% SDS)を加え、全量で1mlとした後、OligoTex-dT30<Super>(宝酒造社製)1mlを加え、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。5M NaCl 0.2mlを加え、37℃で10分間保温した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを洗浄バッファー(10mM Tris-H



C1 (pH 7.5)、1mM EDTA、0.5M NaCl、0.1% SDS) 2.5mlに懸濁した後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を注意深く除去した。ペレットを滅菌水1mlに懸濁し、65℃で5分間加熱し、氷上で3分間急冷した。15,000rpmで3分間遠心分離した後、上清を回収した。50μlの5M NaClと2.5mlのエタノールを加えた後、-20℃で30分冷却し、遠心(3,000rpm、4℃)して、ポリアデニル化RNAの沈殿を回収した。

### (3) cDNAの合成

mRNAからのcDNAの合成は、GublerおよびHoffmanの改良法により、Amersham社製またはInvitrogen社製のcDNA合成キットを用いて行った。すなわち、大腸粘膜上皮細胞より調製したポリアデニル化RNA 5μgを42℃にて90分間、50ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター、1mM dATP、1mM dGTP、1mM dCTP、0.5mM dTTP、100ユニットのAMV逆転写酵素、ピロリン酸ナトリウムを含む緩衝液(Amersham社製) 50μl中で、750ngのランダムヘキサヌクレオチドまたは4μgのオリゴ(dT)プライマーと共にインキュベートした。この反応液50μlを4.0ユニットの大腸菌リボヌクレアーゼH、115ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼIを含む緩衝液(Amersham社製)中で、12℃で60分間、次いで22℃で60分間反応させた後、70℃で10分間インキュベートした。氷中に戻し、10ユニットのT4 DNAポリメラーゼを加え、37℃で10分間反応させた後、10μlの0.25M EDTA (pH 8)を加えて反応を停止させた。反応液250μlに対し、等量の7.5M酢酸アンモニウムと、4倍量のエタノールを加え、攪拌後、-20℃にて30分間冷却し、遠心分離によりcDNAを回収した。cDNAを10μlの滅菌水に溶かし、1μlを用いて0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、合成の確認と濃度の定量を行った。

### (4) アダプターの連結

上記(3)で得た合成cDNAに対して10倍量のモル比となるようにアダプター(EcoRI-NotI-BamHIアダプター、宝酒造社製)を加え、全

体量の8倍量のライゲーション溶液A（ライゲーションキット、宝酒造社製）と1倍量のライゲーション溶液B（ライゲーションキット、宝酒造社製）を加えた。十分攪拌した後、16℃で30分間インキュベートし、アダプターをcDNAへ連結させた。

- 5 この反応液をTAE緩衝液系で0.8%の低融点アガロースゲル（Sea Plaqueアガロース、宝酒造社製）で電気泳動を行い、約4kbp以上のcDNA画分を含むゲルを回収した。この操作により、cDNAに結合しなかったアダプターも同時に除いた。回収したゲルの湿重量に対し、2倍量のTE緩衝液を加え、65℃で10分間保温し、アガロースゲルを溶解した後、全体量に対し等
- 10 量のトリス飽和フェノールを加え、十分に攪拌後、氷冷した。遠心分離により水相を回収し、等量のトリス飽和处理を再び行った。遠心分離により水相を回収し、最後に等量のクロロホルムを加え、十分攪拌後遠心分離した。その後、水相を回収し、1/10量の3M酢酸ナトリウム、20μgのグリコーゲン（ベーリンガーマンハイム社製）、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で30分間冷却
- 15 した後、15,000rpmで10分間4℃で遠心し、cDNAの沈殿を得た。

（5）λgt10ライブラリーの作製

- 上記（4）で得たアダプターを連結したcDNAを96μlの500mM Tris-HCl（pH7.5）、100mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、10mM ATPからなる溶液に溶解し、40ユニットのポリヌクレオチドキナー
- 20 ーゼを加え、37℃で60分間インキュベーションし、アダプターの5'末端をリン酸化した。反応終了後、200μlのTE緩衝液を加え、300μlのトリス飽和フェノールを加え、攪拌後、遠心分離（15,000rpm、室温、2分間）により上清を回収した。同様の遠心分離処理をトリス飽和フェノール・クロロホルム（1:1）溶液、続いて2%イソアミルアルコールを含むクロロホルム
- 25 溶液によって行い、最終的に250μlの上清を得た。この上清に250μlの4M酢酸アンモニウム溶液、1250μlのエタノールを加え、-20℃、30分間冷却後、遠心分離（15,000rpm、4℃、10分間）により沈殿を回収した。cDNAの沈殿に1μgのEcoRI消化脱リン酸λgt10アーム（#233211、Stratagene社製）を加え、終濃度100mM T

Tris-HCl (pH 7.6)、5mM MgCl<sub>2</sub>、300mM NaClの  
溶液5 $\mu$ lに溶解した。ライゲーション溶液B (DNAライゲーションキット、  
宝酒造社製)を5 $\mu$ l加え、十分攪拌した後、26℃で10分間反応させた。c  
DNAを $\lambda$ ファージにパッケージするために、cDNAを含むライゲーション反  
5 応液4 $\mu$ lを、10 $\mu$ lのFreeze/Thaw抽出液 (GigapackII  
gold、STRATAGENE社製)に加え、直ちにSonic抽出液 (G  
igapackII gold)を加え、ゆっくり攪拌した。22℃にて2時間イ  
ンキュベーションした後、500 $\mu$ lのファージ希釈用溶液 (5g NaCl、  
2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、50ml 1M Tris-HCl (pH 7.5)、  
10 5ml 2%ゼラチン/リットル)と、10 $\mu$ lのクロロホルムを加え、インビ  
トロパッケージング反応を終了した。このファージ溶液は4℃に保存し、スクリ  
ーニングに用いた。

実施例4：Fc $\gamma$ BPをコードする全長cDNAのクローニング (B：DNA  
15 プロブを用いたcDNAライブラリーのスクリーニング)

(1) プロットティング

$\lambda$ ファージにパッケージングを行った大腸粘膜上皮細胞のcDNA (2 $\times$ 10<sup>4</sup>  
4 pfu)を、一晚培養した大腸菌株C600 hfl 200 $\mu$ lに感染させた  
後、37℃で15分間保温した。55℃に保温した0.8%トッパアガロース/  
20 LB培地を加えた後直ちにLBプレート (10 $\times$ 14cm)上に広げた後、37  
℃にて12時間インキュベートした。プラークの直径が1mm程度になったとこ  
ろで、ナイロン膜 (Biodyne A、孔径0.2 $\mu$ m、ポール社製)を重ね、  
4℃、10分間冷却した。ナイロン膜をプレートよりはがし、プロットティング溶  
液I (0.5M NaOH、1.5M NaCl)、プロットティング溶液II (1  
25 M Tris-HCl (pH 7.4))、プロットティング溶液III (0.5M  
Tris-HCl (pH 7.4)、1.5M NaCl)で各々5分間処理した  
後、UVクロスリンク装置 (UV Stratalinker 2400、STR  
ATAGENE社製)を用いて1200 $\mu$ ジュールにてDNAをナイロン膜に固  
定した。

## (2) ハイブリダイゼーション

λ DNAを固定したナイロン膜1枚当り、10 mlのハイブリダイゼーション溶液(5×SSPE, 5×Denhardt's溶液、50%ホルムアミド、0.5% SDS、100 μg/ml 熱変性サケ精子DNA)を加え、ハイブリダイゼーションバッグに密封した後、42℃で8時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、抗体スクリーニングにより得られたプローブQ, A, Bを各々α [<sup>32</sup>P] dCTPを用いてランダムプライミング法により放射性標識した。プローブQ, A, Bの各1×10<sup>8</sup> dpmを5 mlのハイブリダイゼーション溶液と共にプレハイブリダイゼーションの終了したナイロン膜に加え、密封後、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。インキュベーションの終了後、ナイロン膜を0.2×SSC、0.2% SDSの溶液で65℃40分間洗浄する操作を3回くり返した後、X線フィルムに一晩露光した。

以上のスクリーニングにより、プローブA, B, Qの1種または、複数とハイブリダイズする69個のラムダクローンを得た。それぞれから、前述の通りの方法でλ DNAを調製し、制限酵素EcoRIで処理した後、電気泳動し、挿入DNAのサイズの確認を行った。

## 実施例5: FcγBP mRNAのサイズ推定

実施例2で得たプローブQを用いてFcγBP mRNAのサイズを推定した。

20 比較のための既知タンパク質のmRNAとして、14.0 kbpのDystrophin mRNA (M. Koenig et al. (1988) Cell 53:219-228) と、15.2 kbpのRyanodine Receptor mRNA (F. Zarzato et al. (1990) J. Biol. Chem., 265:2244-2256) を用いた。これらの対照mRNAに対するcDNAプローブは、いずれも文献から得られる塩基配列をもつ合成プローブを調製し、これらを用いてポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法により作製し、それぞれプローブDYSおよびプローブRDRとした。

Dystrophin mRNAとRyanodine Receptor mRNAの供給源はヒト骨格筋ポリアデニル化RNA (Clontech社製)である。

大腸粘膜上皮細胞より得られたポリアデニル化RNA 2  $\mu$ gまたはヒト骨格筋ポリアデニル化RNA 1  $\mu$ g、あるいは両者の混合物を実施例2の(4)と同様の方法で電気泳動を行い、ナイロン膜上にトランスファーした。このナイロン膜をプローブQを用いてハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーにより検出した。

次いで同じ膜で対照mRNAのハイブリダイゼーションを行うため、このナイロン膜を50mM Tris-HClバッファー(pH7.5)、1.25mM EDTA、3xSSC、1XDenhardt's溶液、1%SDS、50%ホルムアミドを含む溶液20mlとともに、70℃、1時間インキュベーションした。次いで、0.2xSSC、0.1%SDSを含む洗浄液で室温、10分間振とうし洗浄する操作を2回行った。その後、ナイロン膜でオートラジオグラフィーを行い、バンドの消失されたこと(デハイブリダイゼーション)を確認した。

次に、上記と同様の方法にて、プローブDYSによるハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーにより検出した。このナイロン膜を上記と同様の方法でデハイブリダイゼーションを行った後、オートラジオグラフィーでバンドの消失されたことを確認した。最後にプローブRDRによるハイブリダイゼーションを同様に行い、オートラジオグラフィーによるバンドの検出を行った。

以上の結果より得られたDystrophin mRNA、Ryanodine Receptor mRNAの各バンドの移動度を分子サイズに対してプロットを行い、標準曲線を得て、Fc $\gamma$ BP mRNAの移動度よりその分子サイズを約17kbpと推定した(図1)。

#### 実施例6：Fc $\gamma$ BPをコードするcDNAの塩基配列の決定(1)

IgGFc部結合能をもつタンパク質のアミノ酸配列をコードする領域の塩基配列を決定するために、上記実施例4で得られた69個のスクローンの中から、必要な5個のクローンを以下の方法で選択し、DNAシーケンサー(モデル373A、Applied Biosystems社製)で塩基配列を決定した。

##### (1) クローンX1

プローブA、BおよびQとのハイブリダイゼーションによるスクリーニングに

より得られたcDNAクローンの中で、プローブQおよびBとはハイブリダイズせず、プローブAとのみハイブリダイズするクローンを得た。このクローンの挿入cDNAの中でプローブAとは反対側の末端でEcoRIとSmaIによって切り出される約700bpのフラグメントを回収し、これをプローブXとした。

- 5 次に、プローブXを用いて実施例3と同様の方法でcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、プローブXおよびプローブA、BとハイブリダイズするクローンX1を得た。そして、クローンX1の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約3300bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK(+)のEcoRI部位に挿入
- 10 した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決定を行った。

### (2) クローンY1

- クローンX1のcDNAの中で、プローブBを含む部分とは反対側でEcoRIとSacIによって切り出される約800bpのフラグメントを回収し、これをプローブYとした。プローブYを用いて実施例3と同様の方法でcDNAライ
- 15ブラリーのスクリーニングを行い、得られたクローンのうち、最長のcDNAをもつクローンであるクローンY1を得た。そして、クローンY1の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約1900bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK(+)のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決
- 20 定を行った。

### (3) クローンC72

- クローンY1のcDNAの中で、プローブXを含む部分とは反対側でSacIとSphIによって切り出される約150bpのフラグメントを回収し、これを
- 25 プローブY150とした。プローブY150を用いて実施例3と同様の方法でcDNAライブラリー(cDNAサイズが2から4kbpのもの)のスクリーニングを行い、9個のクローンを得た。得られたクローンの挿入cDNA部分の中で、Y150を境としてY領域とは反対側に最も長く伸び、かつY150を含むcDNAを得て、これをクローンC72とした。そして、クローンC72の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約1200bpの

DNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK (+)のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決定を行った。

(4) クローンNZ4

- 5 クローンC72の挿入部cDNAの中で、プローブY150を含む部分とは反対側でEcoRIとSacIによって切り出される約450bpのフラグメントを回収し、これをプローブZとした。ヒト大腸癌由来培養細胞HT29-18-N2株を用いて、実施例3(2)-(5)と同様の方法でλgt10 cDNAライブラリーを作製し、プローブZを用いて実施例3と同様にスクリーニングを行  
10 い、4個のクローンを得た。得られたクローンのうち、C72と重複しない部分を最も長く含むクローンNZ4を得た。そして、クローンNZ4の挿入部cDNAをNotIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約900bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK (+)のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決  
15 定を行った。

(5) クローンV11

- プローブA、BおよびQによるスクリーニングでいずれともハイブリダイズするcDNAクローンのプローブA、Bとハイブリダイズする部分の塩基配列を解析し、先に塩基配列を決定したクローンX1の末端側にあるA-B領域と同一の  
20 塩基配列をもつクローンを得て、クローンV11とした。クローンV11の挿入部cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約3700bpのDNAを分離した後回収し、プラスミドベクターpBluescript SK (+)のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の作製および塩基配列の決定を行った。

25

実施例7: クローンNZ4がFcγBP mRNAの5'末端近傍であることの推定

実施例6で得られた5種のクローンがNZ4-C72-Y1-X1-V11の順に5'末端方向または3'末端方向に向かって伸展しているが、それらの塩基

配列をアミノ酸に翻訳したところ、5'末端方向へ伸びていることが推定された。そこで、現在最上流に位置するクローンNZ4 DNAをプローブとしてランダムプライミングで作製したライブラリーをスクリーニングしたところ、13種の独立したクローンが得られたが、NZ4よりも5'側に伸長したクローンは得られなかった。また、NZ4の塩基配列をアミノ酸へ翻訳したところ、オープンリーディングフレーム上、予想される最も5'上流に位置するメチオニンに対するATGコドン近傍はKozak則に類似していたため、このATGが開始メチオニンである可能性が示唆された。しかし、このATGコドンの最初のAは、クローンNZ4では僅か9番目に位置し、その9塩基内にはin frameにストップコドンは存在しないことから転写産物のみならず翻訳レベルでも5' (N末端) 方向へcDNAの配列が伸長している可能性を否定できない。したがって、プライマーエクステンション法により転写開始部位の検証ならびに翻訳開始部位を推定する目的で以下の実験を行った。

(1) 全RNAとポリアデニル化RNAの調製

15 ヒト大腸粘膜上皮細胞およびHT29-18-N2細胞から、実施例1の(2)または実施例3の(2)と同様に全RNAとポリアデニル化RNAを調製した。

(2) エクステンションプライマーの合成

2種のプライマー、プライマー1: GCTGATAGTTCTGCAGGAA  
GGCTGTGAGGAATTCCTCTCTGCCAGTGTT-50mer、  
20 プライマー2: GCTCCAGCCCAGAGTATCCACCAGCTCCATAGG-33merは、DNA合成機 (Model 394、Applied Biosystems社製) にて合成し、OPCカラム (Applied Biosystems社製) にて精製した。各プライマー100 pmolを $\gamma$  [ $^{32}$ P] ATPにてT4ポリヌクレオチドキナーゼにより末端ラベルし、Micro spin<sup>TM</sup>S-200HRカラム (Pharmacia社製) により精製し、各  
25 0.5 pmolを各反応に用いた。

(3) プライマーアニーリングとエクステンション反応

ヒト大腸粘膜上皮細胞およびHT29-18-N2由来の全RNA (20  $\mu$ g) とポリアデニル化RNA (2.5  $\mu$ g) をそれぞれプライマーとアニーリングバッ



ファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 250 mM KCl) 中で混合し、95℃、5 分間加熱変性し、58℃、1 時間、さらに室温または 37℃で 1.5 時間インキュベートすることによりハイブリダイゼーションを行った。続いて、エクステンション反応を行うため、アニーリングサンプルをエタノール沈殿し、この沈殿を RTase バッファー (33 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM KCl, 13.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 13.3 mM DTT, 0.33 mM dNTPs, 50 µg/ml アクチノマイシン D) に溶解後、20 unit の逆転写酵素 (RNase H-free MM LV RTase, TOYOBO 社製) を加え、42℃、1 時間インキュベートした。反応後、95℃で 3 分処理し RTase を失活させた後、10 µg/ml となるように RNase A を加え、37℃、30 分間インキュベートしてテンプレート RNA を分解した。その後フェノール/クロロホルム、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を順次行った後、5% のシーケンスゲルにて泳動し、泳動後ゲルは固定液 (10% 酢酸、15% メタノール) で処理し、乾燥後オートラジオグラフィを行った。なお、マーカーとして M13mp18 をシーケナーゼ ver 2.0 DNA シーケンシングキット (TOYOBO 社製) で反応させたものを用いた。

以上の方法により次に述べる結果が得られた。いずれの全 RNA 標品をテンプレートとして用いても、プライマー 1 でのエクステンションの結果、プライマーより 118 塩基付近の位置に強いバンドが見られ、またいずれのポリアデニル化 RNA 標品をテンプレートに用いたものでも 118 塩基付近だけでなく、157 塩基付近の位置に弱いエクステンションバンドが見られた。現在最も 5' 側のクローンと考えられる NZ4 の 5' 末端を便宜上 +1 とすると、これらはそれぞれ +27、-13 に相当した。この +27 でエクステンション反応が止まった理由として、NZ4 の 5' 末端近傍の 2 次構造の形成を予測させるパリンδροミックな構造が存在することが挙げられる。事実できるだけそうした 2 次構造を抑える目的で合成したより 5' 側にあるプライマー 2 での結果では -10 から -16 付近にかけて強いブロードなバンドが、さらに -23 に相当する位置に弱いシングルバンドが検出された。そして、-23 より高分子領域にはバンドは検出されな

かった。

以上の結果から、NZ 4の5'末端より10から20塩基上流付近に転写開始部位の存在が示唆され、この範囲にin frameでのATGコドンが存在しない場合には現在ORF上最も5'端にあるATGが翻訳開始部位である可能性が強く推定された。これらの事実はクローンNZ 4がNZ 4-C 72-Y 1-X 1-V 11の順で極めてN末端に近いことを示している。

実施例8：発現cDNA／ベクター系の構築（A：発現に用いた部分cDNAの調製）

10 タンパク質発現のために、FcγBPの部分cDNAの挿入されたλDNAクローン（#NZ 4、#C 72、#Y 1、#X 1、#V 11）を、EcoRIまたはNotIにて切断した後、挿入部のcDNAを還状プラスミドpBluescript SK（+）へサブクロニングし、それぞれpNZ 4、pC 72、pY 1、pX 1、pV 11と命名した。

15 （1）pNZ 4：λクローン（#NZ 4）をNotIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約900bpの挿入部を分離・精製し、pBluescript SK（+）のNotI部位に結合させた。cDNAのタンパク質コードストランドの5'→3'方向がプラスミド中のLacZ遺伝子の方向と逆向きに挿入されたクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号1に示す。

20 なお、本発明の塩基配列表においては、cDNA由来の塩基配列を大文字で、pBluescript SK（+）由来の塩基配列を小文字で、また合成アダプターおよび合成オリゴヌクレオチド由来の塩基配列を小文字のアンダーラインでそれぞれ示した。

また、アミノ酸配列は、Kozak配列と一致するATGを開始コドンとし、  
25 塩基配列よりユニバーサルコドンにより推定した配列を示した。

（2）pC 72：λクローン（#C 72）をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約1300bpの挿入部を分離・精製し、pBluescript SK（+）のEcoRI部位に結合させた。cDNAの5'→3'方向がプラスミド中のLacZ遺伝子の方向と逆向きに挿入されたクローンを

選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号2に示す。

- (3) pY1:  $\lambda$ クローン(#Y1)をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約1900bpの挿入部を分離精製し、pBluescript SK(+)のEcoRI部位に結合させた。同じサイズのDNA挿入部をもつクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号3に示す。

(4) pX1:  $\lambda$ クローン(#X1)をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約3300bpの挿入部を分離・精製し、pBluescript SK(+)のEcoRI部位に結合させた。同じサイズのDNA挿入部をもつクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号4に示す。

- 10 (5) pV11:  $\lambda$ クローン(#V11)をEcoRIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動にて約3700bpの挿入部を分離・精製し、pBluescript SK(+)のEcoRI部位に結合させた。同じサイズのDNA挿入部をもつクローンを選択した。挿入部の全塩基配列を配列番号5に示す。

- 15 実施例9: 発現cDNA/ベクター系の構築(B: タンパク質発現のための部分cDNAの連結)

(1) pNZC7の調製

- cDNAクローンを挿入したプラスミドpNZ4 (5  $\mu$ g)を制限酵素XhoI及びBglII (各々50ユニット)で完全消化した後、低融点アガロースゲル  
20 電気泳動する。Fc $\gamma$ BPのcDNAの5'末端を含む約400bpのフラグメントを分離し、フェノール抽出した後、エタノール沈殿により回収した(フラグメント1)。次に第2番目のプラスミドpC72 (5  $\mu$ g)をXhoIとBglIIで完全消化し、ベクター部分を含む約4.2kbpのフラグメントを同様の方法で電気泳動により単離した(フラグメント2)。フラグメント1とフラグメン  
25 ト2を各々10  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解し、各2  $\mu$ lを16  $\mu$ lのA溶液(DNAライゲーションキット、宝酒造社製)、4  $\mu$ lのB溶液と混合し、16℃にて30分間インキュベートし連結させた。この混合液5  $\mu$ lを100  $\mu$ lのコンピテントE. coli (XL1-Blue)を形質転換し、アンピシリン(100  $\mu$ g/ml)を含むLBプレート上で37℃1晩培養した。生成したコロニーよ

りプラスミドDNAを精製し、フラグメント1とフラグメント2の連結したプラスミドpNZC7を得た。

(2) フラグメント5の調製

pNZC7 (5  $\mu$ g) を各々50ユニットのXhoIとBstXIで完全消化  
5 した後、電気泳動により約1300bpのフラグメントを回収した(フラグメント3)。第3番目のプラスミドpY1 (5  $\mu$ g) を各50ユニットのBstXIとHincIIで完全消化した後、電気泳動により約420bpのフラグメントを回収した(フラグメント4)。フラグメント3とフラグメント4を同様の方法でDNAリガーゼにより連結し、電気泳動を行い両者が1分子ずつBstXI部位  
10 で連結した約1750bpのフラグメントを回収した(フラグメント5)。

(3) pXV2の調製

第4番目のプラスミドpX1 (5  $\mu$ g) をHincII及びBamHI (各50  
ユニット) で完全消化し電気泳動により、約2780bpのフラグメントを回収した(フラグメント6)。第5番目プラスミドpV11をBamHI (50ユニッ  
15 ト) で完全消化し電気泳動により約3350bpのフラグメントを回収した(フラグメント7)。フラグメント6とフラグメント7をDNAリガーゼを用いて連結させ、両者が1分子ずつ連結された約6100bpのフラグメントを電気泳動により回収した(フラグメント8)。このフラグメント8をHincIIとBamHIで消化したpBluescript SK (+) にDNAリガーゼで連結し  
20 た後コンピテントE. coliを形質転換した。複数の形質転換体よりプラスミドを回収した後、各々の塩基配列を決定し、フラグメント6とフラグメント7の方向性が正しく連結されたフラグメント8を含むプラスミドクローンを得て、フラグメント8の5'  $\rightarrow$  3' 方向がプラスミド中のLacZ遺伝子の方向と逆向きに挿入されたものをpXV2とした。

25 (4) pNV11の調製

pXV2をXhoIとHincIIで完全消化後、電気泳動的に約9.1kbpのベクター部分を含むフラグメントを回収した(フラグメント9)。フラグメント9と前記フラグメント5をDNAリガーゼを用いて連結した後、コンピテントE. coli (XL1-Blue) を形質転換した。形質転換体より、約7.8

kbpのcDNA (フラグメント10)を含む約10.8kbpのプラスミドpNV11を得た。

(5) ストップコドン (UAGに対応するもの)を含むオリゴヌクレオチドアダプターの合成

- 5 DNA合成機 (model 394, Applied Biosystems社製)を用いてフレームを異にする3個のTAGを含み、両端にNot I部位とSpe I部位をそれぞれもつ次のオリゴキシヌクレオチド、(1) 5' -CTA GTT AGT TAG TTA GGG TAC CGC-3', (2) 5' -GGC CGC GGT ACC CTA ACT AAC TAA-3' 10 を合成した。オリゴヌクレオチド1及び2各10nmolを混合し(合計146  $\mu$ l)した後、95℃、1分間、次いで85℃、10分間、次いで0.33℃/分の速さで40℃まで徐々に冷却を行い、停止コドンを含むアダプターを作製した (TA-IIIアダプター)。このアダプター (2.1nmol)の5'末端をATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて標準方法にてリン酸化した。
- 15 pBluescript SK (+)ベクター0.83pmolをNot IとSpe Iにて完全消化した後リン酸化したTA-IIIアダプター250pmolと混合し、DNAライゲーションキットを用いて16℃30分間インキュベートし連結させた後、エタノール沈殿した。この沈殿を50  $\mu$ l中にてNot Iで完全消化し、アダプターシーケンス1回だけ持たせるようにした後、低融点アガ 20 ロースゲル電気泳動を行い約3kbpのバンドを回収し、フェノール抽出した後、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を、DNAライゲーションキットを用いて自己連結させた後、コンピテントE. coli (XL1-Blue)を形質転換した。アンピシリンを含むLBプレート上で一晚培養し生じたコロニーより得 25 られたプラスミドのうち、TA-IIIアダプターが挿入されたプラスミドを選択した (pBLS/TAIII)。

(6) pNV11-STの調製

5  $\mu$ gのプラスミド (pNV11)をSpe Iで完全消化した後、電気泳動的に約7.8kbpのフラグメントを回収し、10  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した (フラグメント11)。2  $\mu$ gのプラスミド (pBLS/TAIII)をSpe I

- で完全消化し、バクテリアアルカリホスファターゼ（2ユニット）を用いて末端を脱リン酸化した後、フェノール／クロロホルム処理を2回行い、エタノール沈殿した。沈殿を10  $\mu$  lのTE緩衝液に溶解した（フラグメント12）。各2  $\mu$  lのフラグメント10とフラグメント11を混合し、DNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、コンピテントE. coli（XL1-Blue）を形質転換し、アンピシリンを含むLBプレート上で一晚培養した。生じたコロニーのうち、挿入したcDNAの3'末端側にTA-IIIアダプターが連結されているプラスミドを制限酵素地図及び塩基配列を調べる事により選択した。得られたクローンがpNV11-STである。
- 10 前記プラスミドpNV11-STを含有する大腸菌は*Escherichia coli* XL1-Blue [pNV11-ST]として工業技術院生命工学技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成6年4月1日に生命研条寄第4625号（FERM BP-4625）としてブタベスト条約に基づき国際寄託された。
- 15 なお、Fc $\gamma$ BPの発現に用いた部分cDNA（クローンpNV11-ST）（約7.8 kbp）、ならびにその構築に用いた実施例6に記載のクローンNZ4、C72、Y1、X1およびV11の相互の関係を図2に示す。

- 実施例10：発現cDNA／ベクター系の構築（C：タンパク質発現ベクターへの組込み）
- 20

（1）pcDL-SR $\alpha$ /NOTベクターの作製

- cDNAの組込みを行えるよう次の様にpcDL-SR $\alpha$ 296ベクター（国立予防衛生研究所、武部豊博士より恵与された：以下SR $\alpha$ と記載することもある）の制限酵素部位を改変した。まず、2  $\mu$  gのSR $\alpha$ をEcoRIで完全消化
- 25 した後、エタノールで沈殿した。沈殿をKlenow緩衝液（70mM Tris·HCl（pH7.5）、1mM EDTA、200mM NaCl、70mM MgCl<sub>2</sub>、各1mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP）に溶解し、0.4ユニットのKlenowフラグメントと共に37℃15分間インキュベートし、プラスミドの末端を平滑化した。エタノール沈殿の後、TE緩衝液に

溶解し、5'末端がリン酸化されたNot I リンカーをDNAライゲーションキットを用いて連結した。エタノール沈殿を行った後、Not I で完全消化し、アガロースゲル電気泳動を行い約3.7 kbpのDNAを切出し、フェノール抽出にてDNAを回収した。回収したDNAをライゲーションキットにて自己連結した後、コンピテントE. coli (XL1-Blue) を形質転換した。EcoRIで消化されず、Not I で消化されるような目的のプラスミド(p cDL-SR $\alpha$ /NOT)を選択した。

(2) 発現cDNAの挿入

蛋白発現ベクター(p cDL-SR $\alpha$ /NOT)をNot I とKpn I で完全消化し、電気泳動により約3.7 kbpのフラグメントを回収した(フラグメントA)。

cDNA挿入ベクター(p NV11-ST)をNot I とKpn I で完全消化し、電気泳動により約7.8 kbpのフラグメントを回収した(フラグメント13)。フラグメント13の全塩基配列を配列番号6に示す。

この塩基配列およびそこから演繹されるアミノ酸配列をGenBank Release 1.80により検索したところ、塩基配列およびアミノ酸配列とも新規であることが確認された。

フラグメントAとフラグメント13をDNAライゲーションキットを用いて連結した後、コンピテントE. coli (XL1-Blue) を形質転換した。アンピシリン(100  $\mu$ g/ml)を含むLBプレート上で培養し生じたコロニーのうち、フラグメント13が挿入されたプラスミドを制限酵素切断により選択した。得られたクローンはp NV11-SRである。

実施例11: COS7細胞でのFc $\gamma$ BP部分cDNAの発現

(1) 発現cDNA/ベクターの大腸菌からの回収

実施例10で得られたFc $\gamma$ BP cDNA発現プラスミド(p NV11-SR)にて形質転換した大腸菌を10 mlのLB培地で一晚37℃で振とう培養した。これを500 mlのLB培地に加え、OD<sub>600</sub>が0.8になるまで振とうを続けた。OD<sub>600</sub>が0.8に達したら2.5 mlのクロラムフェニコール溶液

(34 mg/ml)を加え、一晚培養した。菌を遠心分離した後、常法通りアルカリ法にてプラスミドDNAを調製した。塩化セシウムの密度勾配による超遠心分離(90,000 rpm、3時間)を2回行ったのち、TE緩衝液で透析しプラスミドを精製し蛋白発現に用いた。

5 (2) COS7細胞へのトランスフェクション

Fc $\gamma$ BPの約7.8 kbpの部分cDNAを組み込んだプラスミドベクター(pNV11-SR)をCOS7細胞へ一過性に発現させて、タンパク質の性質を調べるために次の様にトランスフェクションを行った。COS7細胞 $2 \times 10^5$ 個を35mmディッシュに加え、10%FBSを含むRPMI 1640培地

- 10 (0.2%炭酸水素ナトリウム、10ユニット/mlペニシリン、0.01%ストレプトマイシンを含む)で一晩培養した。40-60%コンフルエントになったところで、血清を含まないRPMI 1640培地で細胞を2回洗浄した。

- 10  $\mu$ gのpNV11-SRプラスミドを250  $\mu$ lのRPMI 1640培地に溶解したものと、10  $\mu$ lのリポフェクション試薬(Transfectam、  
15 Sepracor社製)を250  $\mu$ lのRPMI 1640培地に溶解したものを混合し、直ちにCOS7細胞上に加える。37℃で6時間培養後、培地を除き、10%血清を含むRPMI 1640培地を2ml加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>で2日間培養した。

(3) 発現タンパク質の確認

- 20 pNV11-SRをトランスフェクションしたCOS7細胞を培養したディッシュ( $\phi$ 35mm)を2mlのPBS(-)で2回洗浄した。99.5%エタノールを2ml加え、室温で5分間固定した。2mlのPBS(-)で2回洗浄した。ラムダファージのスクリーニングに用いたFc $\gamma$ BPに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(K9及びK17)の培養上清1mlをそれぞれ加え、  
25 室温で1時間インキュベートした。PBS(-)にて3回洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を結合したヤギ抗マウスIgG(H+L)F(ab')<sub>2</sub>フラグメント(Zymed社製)を加え室温で30分間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、0.036%過酸化水素水溶液と0.1%ジアミノベンチジン/0.1M Tris HCl(pH7.



2) 溶液の1:1を加え、室温にて10分間発色させ、タンパク質の発現する細胞を確認した。一次抗体を加えずに、二次抗体としてHRP結合ヤギ抗マウスIgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>フラグメントのみを加えたものを対照として用いた。

- 5 結果を図3に示す。K9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(図3、A)およびK17モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(図3、B)培養上清を加えたものでは、いずれもこれらと特異的に反応する細胞が観察されたが、対照(図3、C)では観察されなかった。

10 実施例12: 組換えタンパク質のヒトIgG結合能の検出と性状

(1) ヒトIgGの結合の確認

- FcγBPの部分cDNAを組み込んだプラスミドpNV11-SRをトランスフェクトしたCOS7細胞(φ35mm dish)をPBS(-)で2回洗浄した。99.5%エタノールを2ml加え室温で5分間固定した。2mlのPBS(-)で2回洗浄した。次に、アフィニティークロマトで精製したヒトIgG画分(Cappel社製)を、10%FBSを含むRPMI1640培地にて10μg/mlの濃度に調製し、その1mlをディッシュに加え室温で1時間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、HRPを結合させたヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>画分(#109-D36-088、コスモバイオ社製)にて室温で30分間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、0.036%過酸化水素水溶液と、0.1%ジアミノベンチジン/1.0M Tris HCl (pH7.2)溶液の1:1混液を加え室温にて10分間発色させ、発現タンパク質へのIgGの結合を確認した。

(2) IgGの特異的結合

- 25 pNV11-SRをトランスフェクトしたCOS7細胞(φ35mmディッシュ)を2mlのPBS(-)にて2回洗浄した。99.5%エタノールを2ml加え室温で5分間固定する。2mlのPBS(-)で2回洗浄した。

次に、HRPを結合したアフィニティー精製ヒトIgG画分(#55902、Cappel社製)を10%FBSを含むRPMI1640培地にて10μg/

mlの濃度に調製した(溶液1)。溶液1に対し、次のイムノグロブリン(500  $\mu$ g/ml)を拮抗阻害物質として加えた:

- ①クロマトグラフィー精製ヒトIgG画分(#55908, Cappel社製)
- ②クロマトグラフィー精製ヒトIgG Fc画分(#55911, Cappel社製),
- ③クロマトグラフィー精製ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>画分(#55910, Cappel社製)、
- ④クロマトグラフィー精製ヒトIgM画分(#55916, Cappel社製)
- ⑤クロマトグラフィー精製ヒト血清IgA(#55906, Cappel社製)
- ⑥クロマトグラフィー精製ヒト分泌型IgA(#55905, Cappel社製)

溶液1に上記①から⑥の各拮抗阻害物質を各々別々に加えた溶液1mlを、細胞を固定したディッシュに加え、室温で1時間インキュベートした。2mlのPBS(-)で3回洗浄した後、0.036%過酸化水素水溶液と、0.1%ジアミノベンチジン/0.1% Tris HCl(pH7.2)溶液の1:1の混液を加え、室温にて10分間発色させ、発現タンパク質へのIgGの結合を検討した。溶液1のみで拮抗阻害物質を何も加えなかったものを対照として用いた。

結果を図4および図5に示す。対照実験である無添加条件では細胞が染色される(図4、A)が、精製ヒトIgG画分(図4、B)と精製ヒトIgG Fc画分(図4、C)を添加すると細胞は染色されなかった。一方、他の添加物IgG F(ab')<sub>2</sub>画分(図5、D)やヒトIgM画分(図5、E)、ヒト血清IgA(図5、F)、ヒト分泌型IgA(図5、G)ではHRP結合ヒトIgGの結合を阻害できなかった。このことはヒト抗体の場合IgG Fc部にFc $\gamma$ BPが特異的に結合することを示している。

25

#### 実施例13: Fc $\gamma$ BP mRNA発現の組織特異性

Fc $\gamma$ BPのヒト組織での発現の特異性を調べるために、ノーザンブロッティング解析によりmRNAの発現を調べた。ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓の各組織から精製したポリアデニル化RNA 2  $\mu$ gをブロッティ

ングしたナイロン膜 (Human Multiple Northern Blots、#7760-1、Clontech社製) を、実施例2の(4)と同様の条件でプレハイブリダイゼーションを行った後、 $[^{32}\text{P}]$  でラベルしたプローブYを用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄の後、オートラジオグラフィにてバンドの検出を行った。-80℃で2日間オートラジオグラムを行った結果、胎盤において約17kbp付近にバンドを検出できた(図6)が、その他の組織においては陰性であった。したがって、胎盤においてFcγBPのタンパク発現が推定された。

10 実施例14: 3種の異なるプローブによるノーザンブロット解析

実施例2の(3)で得たプローブQとA、および実施例6の(2)で得たプローブYがいずれも同一のmRNAとハイブリダイゼーションすることを確認するために、大腸粘膜上皮細胞から抽出したmRNAのノーザンブロット解析を上記3種のプローブQ、A、Yを用いて行った。

- 15 大腸粘膜上皮細胞よりAGPC法により抽出した全RNA15μgを4.5μlの滅菌水に溶かした後、2μlの5×MOPS緩衝液、3.5μlのホルムアルデヒド、10μlのホルムアミドと混合し、60℃、15分間熱変性した後、ホルムアルデヒド存在下で1%アガロースゲル上で電気泳動した。電気泳動終了後、RNAをナイロン膜(バイオダイナ、ボール社製)へキャピラリー法にて一晩トランスファーを行った。UV架橋によりRNAをナイロン膜に固定した後、10mlのハイブリダイゼーション溶液(5×SSPE、5×Denhardt's溶液、50%ホルムアミド、0.5% SDS、100μg/ml熱変性サケ精子DNA)中にて42℃、8時間プレハイブリダイゼーションを行った。

- 次いで3種のプローブA、Q、Yを各々、α $[^{32}\text{P}]$  dCTPを用い、メガプライミングキット(Amersham社製)によって放射性標識した。各プローブ $1 \times 10^8$  dpmを各々、5mlのハイブリダイゼーション溶液と共にプレハイブリダイゼーション処理したナイロン膜に加え、密封した後、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜の洗浄は0.2×SSC、0.2% SDSを含む溶液中で、65℃、40分間の洗浄操作を3回繰り返して

た。ナイロン膜を乾燥後、X線フィルムに一晩露光した。

以上の結果、プローブA、Q、Yを用いて推定約17kbpのバンドが1本それぞれ検出され、3種類のプローブが分子量的に同一のmRNAとハイブリダイズすることを確認した(図7)。

5

#### 実施例15:FcγBPをコードするcDNAの塩基配列の決定(2)

IgGFc部結合能をもつタンパク質のアミノ酸配列をコードするcDNAのうち、5'末端から約7.8kbp(7826塩基)までの塩基配列の決定につ

10 

いては実施例4および6に記載した。残された塩基配列約8.6kbpの塩基配

#### (1)cDNAの構造と分類

上記実施例4において、プローブA、BまたはQを用いたハイブリダイゼーショ

ンによるスクリーニングで得られた複数のcDNAクローンを、それぞれ大腸菌

内で増幅した後、プローブA、B、Qを用いてマッピングを行った。その結果、

15 

各クローンは3種のプローブの1つまたは複数とハイブリダイズし、cDNA上にA→BまたはB→QまたはQ→Aの順にプローブ相同部位が位置するものであった。

これらの結果から、FcγBPの遺伝子には、プローブA、B、Qのそれぞれ

と相同な配列がA→B→Qの順に連なった単位がタンデムに複数回繰り返した構

20 

造を有することが推定された。そこで、プローブBとハイブリダイズするcDNAクローンについて、プローブBの塩基配列の一部(約280塩基対)を次のプライマーを用いてPCRにより増幅させた。

プライマー(P-1):

5'-GCC TGC GTG CCC ATC CAG-3'

25 

プライマー(P-2):

5'-CTC ATA GTT GGG CAG GCAC-3'

PCRにより増幅したフラグメントをアガロースゲル電気泳動にて分離後ゲルから回収し、塩基配列を解析した。この塩基配列の違いから、プローブBとハイブリダイズするcDNAクローンを次の3群に分類し、プローブBとハイブリダ

イズしないcDNAクローンを第4群とした。

第1群: クローンV11の増幅フラグメントと同一の配列をもつ群。

第2群: 第1群の配列と比較して5塩基の置換があり、フラグメント中にHincII部位を含まない群。

5 第3群: 第1群の配列と比較して7塩基の置換があり、フラグメント中にHincII部位を含む群。

第4群: プローブBとハイブリダイズしない群。

## (2) クローンT5

3' 末端側のポリA部分をもつcDNAを分離するために、実施例3において  
10 オリゴdTプライマーを用いて作製したcDNAライブラリーを、プローブA、  
BまたはQを用いて実施例4と同様の方法でスクリーニングを行ったところ、  
プローブQのみとハイブリダイズした。得られたcDNAクローンのうち最長のc  
DNA挿入部をもつものをクローンT5とした。

クローンT5の挿入cDNAをEcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動  
15 により分離、精製し、プラスミドベクターpBluescript SK (+)  
のEcoRI部位に挿入した。この後、T5の制限酵素地図の作製および全塩基  
配列の決定を行った。

また、クローンT5挿入部のcDNAのうちで、ポリ(A<sup>+</sup>)から約1キロ塩  
基対5'側のBamHI部位と、同じくポリ(A<sup>+</sup>)から約1.6キロ塩基対5  
20 '側のPstI部位に挟まれた約550塩基対をプローブVとした。プローブV  
はクローンNZ4、C72、Y1、X1、V11、A53、A40およびA31  
とはハイブリダイズせず、T5に特異的な配列であった。

## (3) クローンA43

プローブA、BまたはQとハイブリダイズするcDNAクローンをプローブV  
25 を用いて実施例4の(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行い、プロ  
ーブAおよびBとはハイブリダイズせず、プローブVおよびQとのみハイブリ  
ダイズするクローンを得た。このクローンの挿入cDNAをEcoRIで切断し、  
アガロースゲル電気泳動により分離、精製し、プラスミドベクターpBlues  
cript SK (+)のEcoRI部位に挿入した。この後、制限酵素地図の

作製および全塩基配列の解析を行った。

塩基配列解析の結果、プローブQとハイブリダイズする部分を含む約2キロ塩基対の部分がT5と重複する部分の配列と一致することを確認した。

(4) クローンA8

- 5 クローンA43より5' 方向に伸長したcDNAを得るため、クローンA43の5' 付近の塩基配列(約240塩基対)を増幅可能な次のプライマーを合成した。

プライマー(P-3) :

5' -TGT TGG GAC GAA TGT CGG-3'

- 10 プライマー(P-4) :

5' -TCA CAG CCA ACC TGT GCC-3'

- 実施例15の(1)において分類した第1群、第2群、第3群のcDNAクローンを上記プライマー(P-3)および(P-4)を用いてPCRを行った。PCRにより増幅したフラグメントをアガロースゲル電気泳動にて分離後回収し、
- 15 塩基配列を解析した。これにより、実施例15の(1)において分類した第3群のcDNAクローンの中で、PCRフラグメントの配列がA43と同一の塩基配列をもつものを選択し、クローンA8とした。クローンA8の全塩基配列を解析し、3' 側の塩基配列がA43の5' 側の重複する配列と完全に一致することを確認した。

- 20 (5) クローンA53およびクローンA40

第2群に属するcDNAクローンのうち、プローブQおよびAとハイブリダイズする部分を5' 側にもつ2つの異なるクローンを制限酵素地図より選択した。このうち、クローンV11の3' 側と重複する部分のより長い方をクローンA53、より短い方をクローンA40とした。

- 25 クローンA53およびクローンA40の全塩基配列を解析し、クローンA53の3' 側とクローンA40の5' 側の重複する部分(約2.4キロ塩基対)の塩基配列が同一であることを確認した。また、V11の3' 側とA53の5' 側の重複する約1.8キロ塩基対を比較したところ、1塩基(第6273塩基; V11ではAであり、A53ではG)を除いてこれらの塩基配列が完全に一致するこ

とを確認した。

(6) クローンA31

クローンA40より3' 方向に伸長したcDNAをスクリーニングするために次の操作を行った。クローンA53およびクローンA40において、プライマー  
5 (P-3) およびプライマー(P-4) によって増幅されるフラグメントの塩基配列が第1群のV11の配列と異なり、また第3群のA8の配列とも異なっていたため、この部分の配列を指標に次のスクリーニングを行った。すなわち、全クローン69個のうち第1群と第3群を除くcDNAクローンについてプローブA、BまたはQとハイブリダイズするcDNAクローンを、プライマー(P-3) およびプライマー(P-4) を用いてPCRを行い、増幅したフラグメントの塩基配列を決定した。この塩基配列がクローンA53およびA40と同一であるcDNAクローンを選択した。この中から、PCRの増幅配列を5' 側の端にもち、3' 側に伸長するクローンを選択し、これをクローンA31とした。

クローンA31の全塩基配列を解析した結果、A31の5' 側の配列がクローンA40の3' 側の重複する部分と、またA31の3' 側の配列がクローンA8の5' 側の重複する部分の配列と同一であることを確認した。

実施例16: FcγBPをコードするcDNAの塩基配列の決定(3)

FcγBPのcDNAは全長16.4キロ塩基対の中に、3.5キロ塩基対を  
20 ユニットとする配列(プローブA、B、Qと相同部分を含む)の3回のタンデムリピートが存在し、それぞれの繰り返し配列が互いに95%以上の相同性を有する構造をしていた(図8)。

このリピート構造内の塩基配列の決定に用いたcDNAは、前述の通り、A、BまたはQの各プローブと強い反応性を有することでクローニングされてきた。  
25 そして各々の塩基配列を比較することにより重複する部分の塩基配列が同一であることを確認して、cDNA同士の連なりを明らかにし、これにより一連のcDNA断片が単一のmRNA(遺伝子)に由来するものであることを明らかにしてきた。この事実を再確認するために、既に発現に用いた5' 末端cDNAを含むpNV11SRとは別のリピート構造内のcDNA断片をタンパク質発現させ、

FcγBPを認識するモノクローナル抗体であるK9およびK17によりこの発現タンパク質断片が認識されるかどうかの検定を行った。

(1) 開始コドンを含むアダプターの合成

ベクターに組み込む各cDNA断片を、その5'部分から全長を発現させるには、cDNAの5'部分に翻訳開始コドン(ATG)を連結させなくてはならない。また、翻訳するタンパク質がFcγBPと同一のフレームで翻訳されるために、開始コドン(ATG)とcDNAの5'端の間でフレームを調節する必要がある。そこで、以下の2つの条件を満足するアダプター用オリゴヌクレオチドを合成した。

- 10 合成オリゴヌクレオチドは、FcγBPの本来の開始コドン(ATG)を含むpNV11SRの開始領域と同じ7塩基配列(GCCATGG)を含み、Kozak則に合致するものとする。

また、このオリゴヌクレオチドには、ベクターへの挿入が容易となるように、5'端側にHindIII部位を、3'端側にEcoRI部位を付加する。フレームを調節するために、次の3つのオリゴヌクレオチド(FR-1S、FR-2S、FR-3S)を作製した。そして、それぞれのオリゴヌクレオチドと相補的なFR-1A、FR-2A、FR-3Aをも併せて合成した。

アダプター用合成オリゴヌクレオチド

- FR-1S: 5'-A GCT TCT GCA GCC ATG GG-3'
- 20 FR-1A: 3'-AGA CGT CGG TAC CCT TAA-5'
- FR-2S: 5'-A GCT TCT GCA GCC ATG GGG-3'
- FR-2A: 3'-AGA CGT CGG TAC CCC-5'
- FR-3S: 5'-A GCT TCT GCA GCC ATG GGA G-3'
- FR-3A: 3'-AGA CGT CGG TAC CCT CTT AA-5'
- 25 各オリゴヌクレオチドは、DNA合成機(model 1394、ABI社製)を用いて合成した後、精製を行った。

次に、実施例9-(5)と同様の方法にて、FR-1SとFR-1A、FR-2SとFR-2A、FR-3SとFR-3Aを各々アニーリングした後、5'末端のヌクレオチドをリン酸化した。作製した各アダプターをアダプターFR-1、



アダプターFR-2、アダプターFR-3とする。

(2) T AIII/SKベクターの改変

実施例9-(5)により作製したストップコドンを含むベクターpBLS/T AIIIにXba I部位を付加するために以下の操作を行った。

- 5    すなわち、実施例10-(1)と同様の方法で、pBLS/T AIIIを制限酵素Xho Iで完全消化後、末端を平滑化した。末端をリン酸化したXba Iリンカーを連結後、Xba Iで再消化し、自己連結した後、コンピテントE. coliを形質転換する操作により、pBLS/T AIIIのXho I部位にXba I部位が挿入されたベクターpBLS/T AIII2を得た。

- 10    (3) 開始コドンを含むオリゴヌクレオチドの挿入

- pBLS/T AIII2をEcoRIとHindIIIで完全消化後、アガロースゲル電気泳動にて約3キロ塩基対のベクター部分を回収した。実施例9-(5)と同様の方法で、アダプターFR-1、FR-2、FR-3を各々、上記pBLS/T AIII2に挿入した。塩基配列を解析し、FR-1、FR-2、FR-3の  
15    各アダプターが1つずつ正しく挿入されたプラスミドを得て、各々をFr1-SK2、Fr2-SK2、Fr3-SK2とした。

(4) FcγBP cDNA断片の挿入

- cDNAクローンA53をFcγBPと同じフレームで発現させるために、A53のcDNA部分をEcoRIで切り出した後、Fr3-SK2のEcoRI  
20    部位に挿入した。cDNAの5'末端がFr3-SK2の開始コドン側にある方向のプラスミドを選択し、これをpiF-A53とする。

同様にクローンA8の挿入cDNAをFr2-SK2に挿入してpiF-A8を得た。

- piF-A53とpiF-A8は実施例11-(1)と同様にして精製後、  
25    ンバク発現の実験に用いた。

(5) piF-A53およびpiF-A8の発現

実施例11-(2)と同様の方法にて、piF-A53およびpiF-A8をCOS7細胞にトランスフェクションした。2日間培養後、実施例11-(3)と同様の方法でモノクローナル抗体(K9/K17混液)を用いて細胞染色を行

い、一過性に発現したタンパク質を検出した。その結果、p i F-A 5 3 および p i F-A 8 のいずれをトランスフェクトした細胞もモノクローナル抗体による染色が認められ、両 c DNA が K 9 と K 1 7 のいずれかまたは両方により認識されるタンパク質の一部をコードすることが示された（図 9 の A、B 参照）。これより、A 5 3 および A 8 が F c  $\gamma$  B P の全 c DNA 中の反復配列の一部であることが確定された。

実施例 17 : クローン N Z 4 が F c  $\gamma$  B P mRNA の 5' 末端近傍であることの推定 2

- 10 実施例 7 でのプライマーエクステンションの結果より、現在最も 5' 側に存在するクローン N Z 4 の上流およそ 20 塩基内に転写開始部位が存在し、N Z 4 内に存在する 9 番目の A T G が翻訳開始部位である可能性が推定された。そこで、N Z 4 の上流に i n f r a m e の A T G あるいはストップコドンが存在するかどうかを確認する目的で、ゲノム DNA ライブラリーより F c  $\gamma$  B P 遺伝子を単離し、部分塩基配列を決定した。

(1) ゲノム DNA ライブラリー

ライブラリーは市販のヒト白血球由来（ベクター、EMBL 3 S P 6 / T 7 : C L O N T E C H 社製）のものをを用いた。

(2) プローブ

- 20 スクリーニングに用いるプローブとして、c DNA クローン N Z 4 を B a m H I でベクターより切り出したもの、および実施例 7 で用いた合成オリゴヌクレオチド（プライマー 2 : G C T C C A G C C C A G A G T A T C C A C C A G C T C C A T A G G、33 m e r）をそれぞれ  $\alpha$  [ $^{32}$ P] d C T P、 $\gamma$  [ $^{32}$ P] A T P でランダムプライミングによる標識（N Z 4）、あるいは末端標識（プライマー 2）したものを用いた。

(3) スクリーニング

プローブ N Z 4 によるスクリーニングは実施例 3 で述べた c DNA ライブラリーのスクリーニングの方法に準じて行った。合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたスクリーニングでは、ハイブリダイゼーション溶液のホルムアミド濃度を

20%とし、また洗浄は0.3×SSC/0.1% SDSを含む溶液中で45℃、30分間の洗浄操作を5回繰り返して行った。

各プローブに対し、およそ100万のライブラリーについてスクリーニングを行い、その結果NZ4プローブについて2つの、また合成オリゴヌクレオチドプローブについて1つの陽性ブランクが得られ、それぞれすべてのブランクが陽性となるまで繰り返してスクリーニングを行った。

#### (4) λDNAの抽出

各陽性クローンは、宿主大腸菌LE392を用い、実施例2で述べた方法に準じて増殖させ、DNAを抽出した。

#### 10 (5) 部分マッピングとシーケンス

(4)で得た各々のλDNA (GHFc-1, 2, 3)を制限酵素 (Apa I、BamHI、EcoRI、HindIII、KpnI、NcoI、PstI、SacI、ScaI、SmaI、SpeI、SphI、StuI、XbaI、XhoI)で完全消化し、1%アガロースゲル電気泳動後、サザンブロッティングを行った。ナイロンメンブレンへの転写はゲルを0.25N HClに30分間浸し、続いて変性緩衝液 (0.4N NaOH/1.5M NaCl) 中で15分間×2回室温にて振とう放置し、さらに中和緩衝液 (1M NH<sub>4</sub>OAc/0.02N NaOH) 中で15分間×2回室温にて振とう放置した。その後、ゲル1枚につきメンブレン2枚へ同時に転写 (bidirectional transfer) した。2枚のメンブレンは各々NZ4プローブおよび合成オリゴヌクレオチドプローブにてハイブリダイゼーションを行った。

GHFc-1, 2 (Apa I、EcoRI、SacI、XhoI) およびGHFc-3 (BamHI、EcoRI、XbaI) の各陽性フラグメントをpBluescriptベクター (TOYOBO社製) にサブクローニングし、一部シーケンス反応を行った。シーケンス反応は実施例6の方法に準じて行った。

#### (6) 結果

クローンGHFc-1, 2, 3とも部分的なマッピングとシーケンシングの結果、インサートサイズがおよそ15kb (GHFc-1, 2)、13kb (G

HFc-3)のそれぞれ独立したクローンであり、GHFc-1と2は一部重複していた。また、FcγBP cDNAの63、64番目に相当する塩基間および1311、1312番目に相当する塩基間にGT/AG則に一致したイントロン(図10参照)が存在しており、また1311番目までのエキソン部分の塩基配列はcDNAのものと完全に一致していた(図11参照)。さらに、cDNAクローンNZ4の5'上流はGHFc-3に含まれていたが、実施例7において記載した推定上の翻訳開始ATGより87塩基、すなわちNZ4(配列番号1)の5'端より79塩基上流にin frameでのストップコドン(TGA)が存在し、その間に他のin frameでのATGは認められなかった。したがって、これらの結果はクローンNZ4に存在する9塩基目からのATGがFcγBP遺伝子の翻訳開始ATGである可能性を強く支持する。

#### 実施例18: ヒトFcγBPの構造とIgGFc結合活性機能との相関関係

これまでに得られたFcγBPのcDNAの全塩基配列より推定されたアミノ酸配列をもつタンパク構造は、約400アミノ酸残基より成るユニットのくり返し  
15 配列が合計12回存在し(R1-R12部)、その前後に約450アミノ酸(H部)と約200アミノ酸(T部)のユニークな配列を有するものであった。図12に示すように、R部のくり返しユニットの内、R3、R6、R9は相互に95%以上の相同性を有し、同様にR4、R7、R10の3者、R5、R8、R11の3  
20 者もまた95%以上の相同性があった。一方、R1からR5の各ユニットは相互に約40%程度の相同性があった。そこで、これらの蛋白質ドメインの機能を検討するために、cDNA中にいくつかの欠損部位を持たせた変異クローンを分離し、それらをCOS細胞に発現させ、IgG結合活性などの機能を検討した。

Fc結合活性の測定のため、動物細胞に発現させた部分cDNAプラスミドpNV11は図12に示したように、H、R1、R2、R3、R4、R5及びR6の一部の各ユニットで構成されるが、これらのうちどこにFc結合活性が存在する  
25 のかを確かめるために、以下の実験を行った。即ち、制限酵素による切断・再結合または、連結するクローンの組合せによりNV11の一部をアミノ酸に対するフレームが合う様に欠除したcDNA断片を、発現ベクターSRαに挿入後、大

腸菌XL1-Bを形質転換した。表1に示したように、NV11より一部を削除した後の配列をDNAの塩基番号で示した。尚、NV11のcDNA部分のうち、タンパク質への翻訳の始まる最初の塩基を1番とし、最後の塩基を7776番とする。

- 5 各cDNA断片を含む発現ベクターを大腸菌より精製した後、実施例11と同様の方法で、COS7細胞に一過性に発現させた後、ヒトIgG Fc部による染色、及びFcγBP特異的モノクローナル抗体K9、K17による染色を行った。

- 更に、IgG Fcの結合に対するモノクローナル抗体の阻害を調べるために、次の染色を行った。cDNAを一過性に発現させたCOS7細胞をエタノールで  
10 固定した。熱変性したヒトIgGを1μg/mlとなるように、阻害抗体K9とK17の1つあるいは両方、または抗FcγRⅢ（コントロール抗体）を含むハイブリドーマ培養上清にてそれぞれ希釈し、固定細胞とインキュベートした。室温で1時間放置後、PBS（-）にて洗浄し、HRPを結合した抗ヒトIgG（H+L）抗体F（a b'）<sub>2</sub>フラグメントと同様にインキュベートし、変性ヒトIgGの結  
15 合を検出した。

- 以下に結果を示す。まず、遺伝子発現産物がIgG Fc結合活性を有するかを検討するために、ヒトIgGを一次抗体とし、二次抗体としてHRP標識抗ヒトIgG抗体を用いた。IgGの結合活性を示すのは、H部の全配列及び、それに加え、少なくとも1つ以上のR部の全領域を含有するクローン（NV11、NX、  
20 NZCY、ΔBssH、ΔTth、ΔSp1、ΔBssH/Tth、NXΔBssH、NZCV11）であった。また、IgGの結合活性を示す染色性の強度は、R部の含有数が増加するにつれて強度も増加する傾向にあった。しかし、H部の全部または一部を削除したクローン（ΔHinc、ΔHinc/BssH、V11、X1）及び、R部の一部しかもたないクローン（NZC）ではIgGの結合活性は示さなかった。

25

一方、モノクローナル抗体での遺伝子産物の染色性については、R5配列の全部又は一部をもつクローン（NV11、ΔHinc、ΔBssH、ΔTth、ΔSp1、ΔBssH/Tth、ΔHinc/BssH、NZCV11、V11）ではモノクローナル抗体K9の染色が認められ、また、R3またはR6の全部または一部をもつク

ローン (NZCYとNZCを除く全てのクローン) ではモノクローナル抗体K17の染色が認められた。これらの結果により、H部を欠くクローン ( $\Delta$ Hinc/BssH, V11, X1) ではFc $\gamma$ BP特異的抗体で反応する蛋白質が発現產生されているにもかかわらず、IgG結合活性は得られず、H部はR部産物にIgG活性を与えるに必須な機能を有していることが示唆された。また、クローンNZCがIgG活性およびK9/K17染色に対して陰性であることから、R部(R1~R5)はIgGの結合部位に対応することも示唆された。

続いて、モノクローナル抗体K9, K17によるIgG結合の阻害結果を示す。各クローンに対する阻害効果は表1にまとめて示したが、

10 ① R3とR5に加えて、他の1つ以上のR領域を含むクローン (NV11,  $\Delta$ Tth, NZCV11)では、K9またはK17によりある程度のIgG結合の阻害が認められ、両者を加えたときより強く阻害されたが、完全には阻害されなかった。

② R3に加えて他の1つ以上のR領域を含むクローン (NX) では、K17によりある程度のIgG結合の阻害が認められたが、完全には阻害されなかった。また、K9によっては全く阻害されなかった。

③ R3領域のみを含むクローン (NX $\Delta$ BssH) では、K17により結合が完全に阻害されたが、K9は影響しなかった。

④ R5領域のみを含むクローン ( $\Delta$ BssH/Tth) ではK9により結合が完全20に阻害されたがK17は影響しなかった。

⑤ R3及びR5領域を両方とも含まないクローン (NZCY) では、K9, K17ともIgGの結合を全く阻害しなかった。

⑥ 全てのクローンにおいて、コントロール抗体の抗Fc $\gamma$ R III抗体によるIgG結合の阻害はみられなかった。

25 以上の事より、IgG Fcの結合部位は、R3領域及びR5領域を含めてR1~R5領域に存在し、それぞれのR領域が独立でIgGを結合する事が可能である事が推定された。また、NV11等R領域を複数含むcDNAクローンでは複数のIgGを結合する可能性をもつ事が示された。これらの事実は、アミノ酸配列の相同性から、R1~R12がいずれもIgG結合部位を持ち得ることを推定

させる。

表 1

## 発 現 テ ー ブ ル

クローン名	塩基番号 (始め～終わり)	モノクロ抗体の結合性		抗体なし	IgGの結合	
		K9	K17		+K9	+K17 +K9+K17
NV11	1~7776	+++	+++	+++	++	++
NX	1~4692	-	+++	++	++	++
NZCY	1~3013	-	-	+	+	+
NZC	1~1473	-	-	-	-	-
△Hinc	1~271, 1657~7776	+++	+++	-	-	-
△BssH	1~1600, 2761~7776	+++	+++	++	++	++
△Tth	1~3272, 5477~7776	+++	+++	+++	++	++
△Spl	1~6066	+++	+++	+	+	+
△BssH/Tth	1~1600, 2761~3272, 5477~7776	+++	+++	++	++	++
NX△BssH	1~1600, 2761~4692	-	+++	+	+	+
△Hinc/BssH	1~271, 2761~7776	+++	+++	-	-	-
NZCV11	1~1473, 4165~7776	+++	+++	+++	++	++
V11	4165~7776	-	+++	-	-	-
X1	1445~4692	-	+++	-	-	-



実施例 19 : Fc $\gamma$ B P ゲノム遺伝子の部分解析 (転写開始部位の確定)

実施例 7 でのプライマーエクステンションの結果より、現在最も 5' 側に存在するクローン N Z 4 の上流およそ 20 塩基内に転写開始部位が存在し、N Z 4 内に存在する 9 番目の A T G が翻訳開始部位である可能性が推定されたが、その N Z 4 の上流に in frame の A T G あるいはストップコドンが存在するかどうかを確認する目的でゲノム DNA ライブラリーより Fc $\gamma$ B P 遺伝子を単離し、部分塩基配列を決定した。

また、S 1 マッピングを行い、より正確な転写開始部位の決定を行った。

## (1) ゲノム DNA ライブラリー

- 10       ライブラリーは市販のヒト白血球由来 (ベクター、EMBL 3 S P 6 / T 7 : C L O N T E C H 社) のものを用いた。

## (2) プローブ

- スクリーニングに用いるプローブとして cDNA クローン N Z 4 を Bam H I でベクターより切り出したもの、および実施例 7 で用いた合成オリゴヌクレオチド (プライマー 2 : GCTCCAGCCCAGAGTATCCACCAGCTCCATAGG, 33mer)  
15       をそれぞれ  $\alpha$  [ $^{32}$ P] dCTP、 $\gamma$  [ $^{32}$ P] ATP でランダムプライミングによる標識 (N Z 4)、あるいは末端標識 (オリゴヌクレオチド) したものを  
用いた。

## (3) スクリーニング

- 20       プローブ N Z 4 によるスクリーニングは実施例 4 で述べた cDNA ライブラリーのスクリーニングの方法に準じて行った。合成オリゴヌクレオチドプローブを用いたスクリーニングでは、ハイブリダイゼーション溶液のホルムアミド濃度を 20% とし、また Washing は 0.3 x S S C / 0.1% S D S を含む溶液中で 45°C、30 分間の洗浄操作を 5 回繰り返して行った。  
25       各プローブに対し、およそ 100 万のライブラリーについてスクリーニングを行い、その結果 N Z 4 プローブについて 2 つの、また合成オリゴヌクレオチドプローブについて 1 つの陽性ブランクが得られ、それぞれすべてのブランクが陽性となるまで繰り返しスクリーニングを行った。

(4)  $\lambda$  DNA の抽出

各陽性クローンは、宿主大腸菌 L E 3 9 2 を使い、実施例 2 で述べた方法に準じて増殖させ、DNA を抽出した。

#### (5) 部分マッピングとシーケンス

4 で得た各々の  $\lambda$  DNA (GHFc-1, 2, 3) を制限酵素 (ApaI, BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, NcoI, PstI, SacI, ScaI, SmaI, SpeI, SphI, StuI, XbaI, XhoI) で完全消化し、1% アガロースゲル電気泳動後、サザンブロッティングを行った。ナイロンメンブレンへの転写はゲルを 0.25N HCl, 0.4N NaOH/1.5M NaCl, 1M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ /0.02N NaOH でそれぞれ 15 分、2 回処理した後、ゲル 1 枚につきメンブレン 2 枚へ同時に転写 (bidirectional transfer) した。2 枚のメンブレンは各々 NZ4 プロブおよび合成オリゴヌクレオチドプロブにてハイブリダイゼーションを行った。

GHFc-1, 2 (ApaI, EcoRI, SacI, XhoI) および GHFc-3 (BamHI, EcoRI, XhoI) の各陽性フラグメントを pBluescript ベクター (TOYOBO 社) にサブクローニングし、一部シーケンス反応を行った。シーケンス反応は実施例 6 の方法に準じて行った。

#### (6) S1 マッピング

S1 プロブ作製用テンプレートとして、クローン GHFc-3 の EcoRI/SacI 断片 (cDNA クローン NZ4 の上流約 2kb に相当) を pBluescript SK<sup>+</sup> にサブクローニングした後、ヘルパーファージ VCSM13 により調製した ssDNA を用いた。このテンプレートにプライマーエクステンションで用いたラベルされたプライマー 2 をアニールし、BcaBEST ポリメラーゼ (TAKARA) により 65°C、10 分間合成を行った。これを BamHI 消化し、熱変性後 8M 尿素を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルにて分離し目的とするバンドを切り出した。切り出したゲルは G 緩衝液 (1M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ /20mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ /0.1M EDTA/0.2% SDS/10ug/ml yeast tRNA) 中、37°C で一晩インキュベートしてプロブを溶出した。この S1 プロブ ( $1 \times 10^5$  cpm) をヒト大腸上皮由来全 RNA (40 $\mu$ g) と polyA<sup>+</sup>RNA (1.5 $\mu$ g) を混合し、エタノール沈澱後それぞれ 20 $\mu$ l の S1 ハイブリダイゼーション液 (80% ホルムアミド/40mM PIPES/400mM NaCl/1mM EDTA) に溶解した。これを 80°C で 10 分処理した後、42°C で一晩ハイブリダイゼー

ションを行った。これに200 $\mu$ lのS1溶液(30mM NaOAc (pH4.6) / 280mM NaCl / 1mM ZnSO<sub>4</sub> / 1mg/ml ssDNA / 150unit S1ヌクレアーゼ)を加え37°C 40分間消化した。これを6%のシークエンスゲルにて泳動しゲルは固定、乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

## 5 結果と考察

クローンGHFc-1, 2, 3とも部分的なマッピングとシークエンシングの結果、インサートサイズがおおよそ15kbp (GHFc1, 2), 13Kbp (GHFc3)のそれぞれ独立したクローンでありGHFc1と2は一部 overlapしていた。また、Fc $\gamma$ BPcDNAの63、64番目に相当する塩基間および1311、1312番目に相当する塩基間にGT/AG則に一致したイントロンが存在しており1311番目までのエキソン部分の塩基配列はcDNAのものと完全に一致していた(図10, 11参照)。さらに、cDNAクローンNZ4の5'上流はGHFc3に含まれており、推定上の翻訳開始ATGより87base, NZ4の5'端より79base上流にin frameでのストップコドン(TGA)が存在し、その間に他のin frameでのATGは認められなかった。従って、これらの結果はクローン NZ4に存在する9番目のATGがFc $\gamma$ BP遺伝子の翻訳開始ATGである可能性を強く支持するものである。また、NZ4の5'上流およそ2kbp内にTATA/CCAAT等の典型的なプロモーターモチーフは含まれていなかった。さらに、S1マッピングの結果から、このATGより8, 9, 10塩基上流に相当する長さのバンドが見られ、その内10のA残基でもっともそのシグナルが強いことから、このA残基より転写が開始するものと考えられた。

### 実施例20: Fc $\gamma$ BP遺伝子多型の解析

Fc $\gamma$ BP cDNAのシークエンスの結果、コーディング領域内の特定部位に遺伝子多型の存在が示唆された。すなわちFc $\gamma$ BP cDNAの5120, 8723, 12326番目に存在するSmaI部位についてクローンA52の同領域ではCCCGGGからCCTGGGへの塩基の置換が認められた。cDNAクローニングに用いたライブラリーは単一遺伝子由来ではなく数人の遺伝子をその由来とするために、この塩基置換が個体間で認められるものかあるいは同一個体において半数体ゲノムあたり存在する主要な3回の繰り返し領域間に認められるものかどうかを確認するために以下の実験

を行った。

Forward側プライマーとして

BC1:ACCACTCCTTCGATGGCC,

GS1:ACCTGTAACATATGTGCTGGC, の2種、

5 Reverse側プライマーとして

GS2:TGGTGGTGACGGTGAAGGG,

GS3:ACAGCAGGGTTGCCCCGG,

GS4:TGGTGCCGAGGGCAGCCACG,

BC2:TGGGTCACTGAAATCCG, の4種を合成した。

10 また6名の健常人白血球並びに4名の担癌患者大腸の正常部位より上皮細胞を分離後、Nelson等の方法によりDNAを抽出した。各DNA20ngにプライマーセットBC1/BC2, BC1/GS3, BC1/GS4, GS1/GS3, GS1/GS4を終濃度20pmoleで加え、PCR緩衝液(10mM Tris HCl pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200μM dNTPs, 0.001% gelatin, 2.5unit taqポリメラーゼ)中、(94°C 1min-60°C 1.5 min -  
15 72°C 2.5 min x 30サイクル)の条件でPCRを行った。PCR産物はSmaI消化後2%アガロースゲルにて泳動し、EtBrにて染色を行った。

以上の結果、各プライマーセットに対するPCR産物をSmaI処理することによりプライマーBC1/BC2を除いた各セットで遺伝子多型が存在することが明かとなった。

20 すなわち、10種のDNA標品の内、1つはSmaIにて完全消化されることからこのサンプルは少なくとも対立遺伝子を含めた6カ所の繰り返し部位すべてにSmaI部位が存在し、他のサンプルではSmaIでの消化、未消化産物の割合が各種の頻度で観察された。逆に、これら10サンプルの内SmaIサイトをも全くもたないものは存在しなかった。また、HT-29N2細胞において同じプライマーセットを用  
25 いてRT-PCRした後、SmaIにて消化したところ、全てそのサイトを含んでいた。

また、プライマーBC1/BC2で多型が認められなかった理由としてPCR産物の鎖長が約1.8kbpあることからプライマーGS4とプライマーBC2の間におよそ1.6kbpのイントロンが存在し、このイントロンの5'側にSmaI部位が存在することが示

唆された。この部位と多型を示す目的のSmaI部位間の長さが非常に短く、BC1/B C2での増幅産物とそのSmaI消化産物との鎖長差が僅かであるために多型が検出されなかったものと推定された。

#### 5 実施例21：誘導型高発現CHO細胞株の分離とFcγBPの検出

実施例11で示したFcγBPフラグメントを多量に、安定して発現する細胞株を樹立する目的で、動物細胞用発現ベクター、pMSXNDを用いてFcγBP部分cDNA、NV11STを発現させた。pMSXNDベクターは蛋白発現の誘導がナトリウムブチレートなどにより可能なメタロチオネインプロモーターを発現プロモーターとして有し、染色体DNAに組み込まれた後に遺伝子増幅を可能にするdhfr遺伝子をもつ様構築されている。

##### (1) pMSXNDベクターの改変

まず、pMSXNDのcDNAクローニング部位であるXhoIにてプラスミドを完全消化した後、0.4単位のKlenow Fragmentにて15分間処理し、末端を平滑化した。

次に、NotIリンカー(5'-pGCGGCCGC-3')をベクターにライゲーションした後NotIで完全消化し、自己連結させてからコンピテントE. coli XL1-Bを形質転換した。得られたクローンを解析し、pMSXNDのXhoI部位にNotIリンカーが挿入されたプラスミドpMSXND-NOTを得た。

##### 20 (2) cDNAの挿入

pMSXND-NOTをNotIで完全消化した後、アルカリフォスファターゼ処理により脱リン酸化を行った。次に、実施例6-(6)で作製したFcγBP cDNAを組み込んだプラスミドであるpNV11-STをNotIで完全消化し、アガロースゲル電気泳動にて8kbpのcDNA部分を分離、回収した。これらの発現ベクターとcDNA挿入部分をライゲーションし、コンピテントE. coli (XL1-B)を形質転換した。アンピシリンを含むLBプレート上で培養し生じたコロニーのうち、メタロチオネインプロモーターに対しセンスの方向でcDNAが挿入されたプラスミドを選択し、pNV11-MSXを得た。

##### (3) CHO細胞でのIgG FcBP部分cDNAの発現

実施例 11 と同様の方法にて pNV11-MSX プラスミドを含む大腸菌を培養し、増幅したプラスミドを精製した。このプラスミド 10 $\mu$ g を 250 $\mu$ l の F-12 培地（ヌクレオチド添加）に溶解したものと、10 $\mu$ l のリポフェクション試薬（Transfectum, SEPRACOR 社）を 250 $\mu$ l に溶解したものを混合し、直ちに CHO 細胞（dhfr 欠損株）5 上加えた。37°C で 6 時間培養後、10% 血清を含む F-12 培地で置換し 3 日間培養した。次に、培地を 1 mg/ml の G418、10% 牛胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地（ヌクレオチド不含、GIBCO 社製）に置換し、3 日毎に培地交換しながら 14 日間培養し、プラスミドの挿入された細胞を選択した。このようにして数十個のコロニーを形成したディッシュより、限界希釈法にて細胞をクローニングした。得られた細胞クローンのうち Fc 結合活性の高い蛋白発現を示すものを選択し、より多くの発現量を得るために次に遺伝子増幅を行った。

#### （4） 遺伝子増幅

pNV11-MSX が CHO 細胞の染色体に組み込まれ、安定に Fc $\gamma$ B P フラグメントを発現する細胞クローンの蛋白質産生量を増加させるために、メトトレキセート処理によって組み込み遺伝子の増幅を行った。15

即ち、前記の安定発現細胞クローンを、0.005 $\mu$ M のメトトレキセート、500 $\mu$ g/ml の G418 含む  $\alpha$ -MEM 培地（ヌクレオチド不含）にて 3-4 週間培養し、生育する細胞を選択した。次に、メトトレキセート濃度を 4 倍（0.02 $\mu$ M）に増加し、同様の方法で 3-4 週間培養した。メトトレキセート濃度を 4 倍に増加させ培養する操作をくり返し、最終的に 6.4 $\mu$ M~25 $\mu$ M のメトトレキセート存在下で増殖する細胞を得た。この細胞を限界希釈法にてクローニングを行い、Fc $\gamma$ B P フラグメントを高発現する細胞株を得た。発現量の増加は、実施例 11 および 12 におけると同様に、K9/K17 モノクローナル抗体による組織化学的染色または IgG 結合能の検出法による第一次的判定によった。

#### 25 （5） 細胞試料の作製

Fc $\gamma$ B P フラグメントを安定的に高発現する CHO 細胞株 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 細胞を  $\phi$ 100 mm ディッシュに移し、6.4 $\mu$ M メトトレキセート、1 mg/ml G418 を加えた  $\alpha$ -MEM 培地にて培養した。必要に応じて終濃度 5 mM となるようナトリウムブチレートを追加し、蛋白質の発現誘導を行った。3 日後に、培養上清（SUP1）を採取し、

さらにSUP 1から細胞片を除くため100,000xg、60分間遠心後、上清(SUP 2)を回収した。細胞は、500 $\mu$ lの細胞溶解緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 10mM monoiodo acetamide, 10 $\mu$ g/ml aprotin ine, 10 $\mu$ g/ml leupeptin)に懸濁後、超音波処理(30秒 $\times$ 3回)を行い、10,000xg、10分間4 $^{\circ}$ Cの遠心を行った。遠心後の上清(LYS 1)を除き、残渣に、1%NP-40を含む細胞溶解緩衝液400 $\mu$ lを加え、超音波処理後、遠心し上清を回収した(LYS 2)。更にこの残渣に1%NP-40, 0.1%SDS, 0.5%デオキシコール酸ナトリウムを含む細胞溶解緩衝液200 $\mu$ lに溶解後、遠心し上清を回収した(LYS 3)。残渣は100 $\mu$ lの細胞溶解緩衝液に懸濁した(LYS 4)。また、コントロールとして大腸上皮細胞の溶解液(1/100 $\sim$ 1/3200希釈)を用いた。

#### (6) サンドイッチELISA

産生されたFc $\gamma$ B Pフラグメントを定量的に検出するために、Fc $\gamma$ B Pに対する特異的モノクローナル抗体K 9およびK 17を用いたサンドイッチELISA系の開発を行った。アフィニティー精製したK 9抗体を5 $\mu$ g/mlとなるよう0.05M炭酸緩衝液(pH9.2)にて調製し、50 $\mu$ l/ウェルでELISAプレート(PRO-BIND, フェルコン社製)に加えた後、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。ウェルを洗浄溶液(0.05%Tween-20を含むPBS(-))で3回洗浄した後、ブロッキング溶液(10%血清を含むRPMI 1640培地)を50 $\mu$ l/ウェル加え、温室で60分間放置した。

ブロッキング溶液を除き、(5)にて調製した試料を各々50 $\mu$ l加え、室温2時間放置した。洗浄溶液にて3回洗浄し、ブロッキング溶液にて4mg/mlに希釈したHRP結合K 17抗体を50 $\mu$ l加え、室温1時間放置した。洗浄溶液にて3回洗浄後、50 $\mu$ lの発色液(20mg 0-phenylenediamine, 80 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%)を50mlのクエン酸緩衝液に溶解)を加え、室温で3分間発色させた。50 $\mu$ lの2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を加え反応を停止してから492nmの吸光度を測定した。

#### 〔結果〕

##### (i) 得られた代表的なFc $\gamma$ B P発現CHO細胞株について

メトトレキセート存在下で培養後、ナトリウムブチレート処理後および未処理

後3日目におけるFc $\gamma$ B Pフラグメントの発現量をK9/K17モノフローナル抗体による細胞染色法により検出した。図13に示すように、高発現株が分離できた。

(ii) ELISAによるFc $\gamma$ B Pフラグメントの定量結果

- 5 Fc $\gamma$ B Pフラグメントの安定高発現株から調製された各試料をサンドイッチELISA法にて測定した結果、次の表2の吸光度が示す様に、Fc $\gamma$ B Pフラグメントは細胞溶解液中(LYS 1~4)に比べて、培養上清中(SUP 1, 2)により多く検出された。この事実は発現させたFc $\gamma$ B Pフラグメントは細胞内に蓄積するのではなく細胞外に分泌されることを示している。



表 2

試 料			OD <sub>492</sub>
大腸上皮細胞溶解液 (コントロール)	1/100 希釈		2.184
	1/200		2.024
	1/400		1.516
	1/800		0.935
	1/1600		0.514
	1/3200		0.264
発現誘導細胞	SUP1		0.731
	SUP2		0.712
	LYS1		0.044
	LYS2		0.174
	LYS3		0.013
	LYS4		0.095
発現非誘導細胞	SUP1		0.259
	SUP2		0.273
	LYS1		0.027
	LYS2		0.070
	LYS3		0.012
	LYS4		0.019

## 【配列表】

## 【配列番号 1】

配列番号：1

配列の長さ：908

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTGCAGCCAT	GGGTGCCCTA	TGGAGCTGGT	GGATACTCTG	GGCTGGAGCA	50
ACCCCTCTGT	GGGGATTGAC	CCAGGAGGCT	TCAGTGGACC	TCAGAPACAC	100
TGGCAGAGAG	GAATTCCTCA	CAGCCTTCCT	GCAGAACTAT	CAGCTGGCCT	150
ACAGCAAGGC	CTACCCCGGC	CTCCTTATCT	CCAGTCTGTC	AGAGAGCCCC	200
GCTTCAGTCT	CCATCCTCAG	CCAGGCAGAC	AACACCTCAA	AGAGGTGAC	250
AGTGAGGCCC	GGGAGTCGG	TCATGGTCAA	CTCAGTGCC	AAGGCTGAGA	300
TGATAGGCAG	CAAGATCTTC	CAGCATGCCG	TGGTGATCCA	TTCTGACTAT	350
GCCATCTCTG	TGCAGGCACT	AAATGCCAAG	CCTGACACAG	CGGAGCTGAC	400
ACTGCTGGGG	CCCATCCAGG	CCCTAGGCAC	CGAGTATTTT	GTGCTCACAC	450
CCCCCGGCGC	CTCAGCCAGG	AATGTCAAGG	AGTTTGGCGT	GSTGGCGGCT	500
GGCGCAAGTG	CCTGGGTGAG	TGTACCGGTG	AAGGGGTGAG	TGACATTCAA	550
TGCGAAGTTC	TTTCCAGGAG	GCGATGTCTT	AAGAGTGACT	CTACAGCCCT	600
ACATATGTGG	CCAGCTACAG	AGCTCAGTGG	ATCTCTGGGG	GTCAAAGGTC	650
ACAGCTAGTA	GGCCCGTGGC	TGTCCTCTCT	GGCCACAGCT	GTCGGCAGAA	700
ACATACGACC	TGCAACCATG	TGGTTGAGCA	GCTGCTACCC	ACGCTGCGCT	750
GGGGCAACCA	CTATGTAGTA	CCACCGCTGG	CCTCCCAATC	TGGCTATGAT	800
TTGGCCTTGG	TTGTGGCCAG	CCAGGCCACA	AAGCTGACCT	ACAACCATGG	850
GGGATTCACT	GGCTCCCGTG	GGCTCCAGGC	AGGTGATGTG	GTAGAGTTTG	900
AGGTCCGG					908

## 【配列番号2】

配列番号：2

配列の長さ：1336

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGCCTACAGC	AAGGCCTACC	CCCGCCTCCT	TATCTCCAGT	CTGTCAGAGA	50
GCCCCGCTTC	AGTCTCCATC	CTCAGCCAGG	CAACACACAC	CTCCTAAGAG	100
GTCACTAGTA	GGCCCGGGGA	GTCGGTCATG	GTCAACATCA	GTGCCAAGGC	150
TGAGATGATA	GGCAGCAAGA	TCTTCCAGCA	TGCGGTGGTG	ATCCATTCTG	200
ACTATGCCAT	CTCTGTGCAG	GCACTAAPTG	CCAGGCTGA	CACAGCGGAG	250
CTGCACTGTC	TCCGGCCCAT	CCAGGCCCTA	GGCACCAGT	ATTTTGTGCT	300
CACACCCCCC	GGCACCCTCAG	CCAGCAATGT	CAAGGAGTTT	GCCGTGGTGG	350
CCGGTGCCGC	AGGTGCCTCG	GTCAGTGTCA	CGCTGAAGGG	GTCAGTGACA	400
TTCAATGGCA	AGTTCATATC	AGCAGGCGAT	GTCTTAAGAG	TGACTCTACA	450
GCCCTACAPT	GTGGCCCAAG	TACAGAGCTC	AGTGGATCTC	TCCGGGTCAA	500
AGGTACACAG	TAGTAGCCCC	GTGGCTGTCC	TCTCTGGCCA	CACTGTGGCG	550
CAGAAACATA	CGACCTGCPA	CCATGTGGTT	GAGCACTGTC	TACCCACGTC	600
TGCCTGGGTC	ACCCACTATG	TAGTACCCAC	GCTGGCCTCC	CAATCTCGCT	650
ATGATTTGGC	CTTCGTTGTG	GCCAGCCAGG	CCACAAAGCT	GACCTACAAC	700
CATGGGGGTA	TCACTGGCTC	CCGTGGGCTC	CAGGCAGGTG	ATGTGGTAGA	750
GTTTGAGGTC	CGGCCATCCT	GCCCACTCTA	CCTGTCTGCA	AATGTGGGCA	800
TCCAGGTCTT	GTTGTTTGGC	ACAGGTGCCA	TAGGAATGA	AGTGACTTAT	850
CACCCCCTACC	TGGTCTGTAT	CCCAGATGTG	GCGGCCTACT	GCCCAGCCTA	900
TGTGGTCTAG	AGTGTACCA	GCTGTGAGGG	CGTGGCCCTG	GTAGTGGCAC	950
AGACGAGGSC	TATCAGGGGG	CTGACCATAG	ATGGGCATGC	AGTGGGGGCG	1000
AAGCTCACCT	GGGAGGCTGT	GCCAGGCAGT	GAGTCTCTGT	ATGCTGAAGT	1050
GGAGCTCGGC	ACAGCTGACA	TGATCCACAC	GGCCGAGGCG	ACCACCAACT	1100
TGGGACTGCT	CACCTTCGGG	CTGGCCPAGG	CTATAGGCTA	CGCAACAGCT	1150
GCTGATTGGG	GCCGGACTGT	ACTGTCCCCA	GTGGAGCCCT	CCTGCGAAGG	1200
CATGCAGTGC	GCAGCCGGGC	AGCGCTGCCA	GGTGGTAGGC	GGGAAGGCGG	1250
GGTGTGTGGC	GGAGTCCACC	GCTGTCTGCC	GCGCCAGGG	CGACCCCAT	1300
TACACCACCT	TCCACGGCCG	TCCGTACGAC	ATGATG		1336

【配列番号 3】

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 8 7 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : cDNA

配列

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCAAGCTCAC	CTGGGAGGCT	GTGCCAGGCA	GTGAGTTCCT	GTATGCTGAA	50
GTGGAGCTCG	GCACAGCTGA	CATGATCCAC	ACGGCCGAGG	CCACCACCPA	100
CTTGGGACTG	CTCACCTTCG	GGCTGGCCAA	GGCTATAGGC	TACGCAACAG	150
CTGCTGATTG	CGGCGGGAAT	GTACTGTCCC	CAGTGGAGCC	CTCCTGCGAA	200
GGCATGCACT	GGGAGGCGG	GCAGCGCTGC	CAGGTGGTAG	GCGGGAAGGC	250
CGGGTGTGTG	GGGAGTCCA	CGCTGTCTG	CGGCGCCGAG	GCGGACCCCC	300
ATTACACCAC	CTTCGACGGC	CGTCGCTACG	ACATGATGGG	CACCTGTTCC	350
TACACGATGG	TGGAGCTGTG	CAGCGAGGAC	GACACCCCTG	CGGCTTTCAG	400
CGTGGAGGCG	AAGAACGAGC	AACGGGGCAG	CGGCGCGGTC	TCTACGTGG	450
GGCTCGTAC	TGTGGCGGCG	TACAGCCACT	CTGTGTCCGT	GACCCGCGGT	500
GAAGTGGCT	TGCTCCTGGT	TGACAAACCAG	CGCTCGGCGC	TGCGAGTCTC	550
CCTGAGTGAG	GGTCGCGCTG	GTGTGTACCA	GAGCGGACCA	CGGCGCGTGG	600
TGGAGCTGGT	CTTTGGGGTG	GTGGTCACTT	ATGACTGGGA	CTGCCAGCTG	650
GCATCTAGCC	TGCTGACAG	CTTCCAGAC	CAGGTGTGCG	GGTGTGTGG	700
CAACTATAAT	GGTGAACAG	CAGACGACTT	CCTCAGGCT	GACGGGCTC	750
TGGGTCCTGA	CGCTGTGGAG	TTCGCAAGTA	GCTGCAAGCT	GGATGATGGG	800
GACTACCTGT	GTGAGGATGG	CTGCCAGAAC	AATGTGCCG	CCTGTACCCC	850
AGGCCAGGCC	CAACACTATG	AGGGCGACCG	ACTCTGTGGC	ATGCTGACCA	900
AGCTCGATGG	CCCTTCGCT	GTCTGCCATG	ACACCTTGA	CCCCAGGCCC	950
TTCTTGGAGC	AGTGTGTATA	TGACCTGTGT	GTGGTGGGTG	GGGAGCGGCT	1000
CAGCTGTGTC	CGTGGCTTCA	GCGCCTATGC	CCAGGCTGT	CTGAGGCTTG	1050
GCATCTCGGT	TGGGGACTGG	AGATCAACAG	CCACTGCCC	CCTGTCTCTG	1100
CCTGCCAACA	GCCGCTATGA	GCTCTGCGGC	CCTGCTTGCC	CGACCTCCTG	1150
CAACGGGGCT	GCGGCGCGGT	CCACTGCTC	GCGGCGCCCC	TGCGTGGAGG	1200
GCTGCGTGTG	CCTCCAGGC	TTCGTGGCCA	GCGGCGGGCC	CTGCGTGGCG	1250
GGCTCGTCTG	GTGGCTGCG	CTCCAGGGT	CTCCAGCTCG	CTCCGGGCCA	1300
GGAGTGTGG	GCGGACGAGT	TGTGCCAAAG	GCGCTGCACC	TGCAACGGCG	1350
CCACCCATCA	GGTCACCTGC	CGCGACAAGC	AGAGCTGCCC	GCGGGGTGAG	1400
CGCTGCAGCG	TCCAGAAGCG	CCTCCTGGGC	TGCTACCCCG	ATCGCTTCGG	1450
GACCTGCCAG	GGGTCCGGGG	ACCCACACTA	TGTGAGCTTC	GACGGCCGGC	1500
GCTTCGACTT	CATGGGCACC	TGCACGTACC	TGCTGGTCCG	CTCATGGCGC	1550
CAGAAGCGAG	CGCTGCTGTC	CTTCCGGGTG	CTGGTGGAPA	ACGAGCATCG	1600
GGGAGGCGAG	ACTGTGAGCT	ACACGGCGGC	CGTCCGGGTG	GAGGCGCGCG	1650
GGGTGAGGT	GCGCGTGGCG	CGGGAGTACC	CGGGGCAAGT	GCTGGTGGAT	1700
GACGTCTTTC	AGTATCTGCC	CTTCCAGCA	GCAGATGGGC	AGGTGCAAGT	1750
GTTCGGACAG	GCGAGGGATG	CGTCTGTGCG	CACGGACTTT	GCCCTGACTG	1800
TCACATATGA	CTGGAATGCA	CGAGTGAAGT	CCAGGTGCC	CAGCAGCTAT	1850
GCTGAGGCCC	TGTGTGCACT	CTGTGGGA			1878

【配列番号 4】

配列番号： 4

配列の長さ： 3 2 4 7

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直線状

配列の種類： cDNA

配列

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTTCGACGGC	CGTCGCTACG	ACATGATGGG	CACCTGTTCG	TACACGATGG	50
TGGAGCTGTG	CAGCGAGGAC	GACACCTTGC	CCGCCCTTCAG	CGTGGAGGCC	100
AAGAACCAGC	ACCGGGGCGAG	CCGCCGGGTC	TCCTACGTGG	GCCTCGTCAC	150
TGTGGCGGCC	TACAGCCACT	CTGTGTGGCT	GACCCGCGGT	GAAGTTGGCT	200
TGGTCTGGT	TGACAACCAG	CGCTCCGGCC	TGCCAGTCTC	CCTGAGTGAG	250
GGTGGCCTGC	GTGTGTACCA	GAGCGGACCA	CGGGCGGTGG	TGGAGCTGGT	300
CTTTGGGGTG	GTGGTCACTT	ATGACTGGGA	CTGCCAGGTG	GCACTCAGCC	350
TGGCTGGACG	CTTCCAGAC	CAGGTGTGGC	GGTGTGTGG	CAACTATAAT	400
GGTGAACCCAG	CAGAGCACTT	CCTCAAGGCT	GAAGGGGCTC	TGGCTCCTGA	450
CGGTGTGGAG	TTGGCAAGTA	GCTGGAGGCT	GATGATGGG	GACTACCTGT	500
GTGAGGATGG	CTGCCAGAAC	AAGTGTCCCG	CCTGCACCCC	AGGTCAGGCC	550
CAACACTATG	AGGGCGACCG	ACTCTGTGGC	ATGCTGACCA	AGCTCGATGG	600
CCCTTCGGCT	GTCTGCCATG	ACACCTGGGA	CCCCAGGGCC	TTCTGGAGC	650
AGTGTGTATA	TGACCTGTGT	GTGGTGGGTG	GGGAGCGGCT	CAGCCTGTGC	700
CGTGGCCTCA	GCGCCTATGC	CCAGGCTGTG	CTGGAGCTTG	GCACTCTCGT	750
TGGGGACTGG	AGATCACCAG	CCAACTGCCC	CCTGTCTCTG	CCTGCCAACA	800
GCGGCTATGA	GCTCTGGGGC	CCTGCTTGCC	CGAAGCTCTG	CACGGGGGCT	850
GCGGGCGCGT	CCAAGTGTCT	CGGGCGGGCC	TGGGTGGAGG	GCTGGGTGTG	900
CCTCCCAAGC	TTGGTGGCCA	GCGGGCGGGC	CTGGGTGGCG	GCCTCGTCTG	950
GTGGGTGGAC	CTTCCAGGGT	CTCCAGCTGG	CTCCGGGGCA	GGAGTGTGG	1000
GCGGACGAGT	TGTGCCAAGG	GCGGTGCCAC	TGCCAAGGGC	CCACCCATCA	1050
GGTCAAGCTG	CGCGACAAGC	AGAGCTGCCC	GGCGGGTGAG	CGCTGCAGCG	1100
TCCAGAACGG	CCTCCTGGGC	TGCTACCCCG	ATCGCTTCGG	GACCTGCCAG	1150
GGGTCCGGGG	ACCCACACTA	TGTGAGCTTC	GACGGCGGGC	GCTTCGACTT	1200
CATGGGACCC	TGCAGGTACC	TGCTGGTGGG	CTCATCGGGC	CAGAACGCCG	1250
CGGTGGCTGC	CTTCCGGGTG	CTGGTGGAAA	ACGAGCATCG	GGGCAGCCAG	1300
ACTGTGAGCT	ACAAGCGGGC	CGTGGGGGTG	GAGGCGGGCG	GGGTGAAGGT	1350
GGCCGTGGGC	CGGGAGTACC	CGGGGCAAGT	GCTGGTGGAT	GACGTCTTTC	1400
AGTATCTGCC	CTTCCAGACA	GCAGATGGGC	AGGTGCAGGT	GTTCGGACAG	1450
GGCAGGGATG	CCGTCTGTGG	CACGGACTTT	GGCTGACTG	TCACTTATGA	1500
CTGGAAATGA	CGAGTCACTG	CCAAGGTGCC	CAGCAAGTAT	GCTGAGGGCC	1550
TGTGTGGACT	CTGTGGGAAC	TTCAACGGGG	ACCCAGCTGA	TGACCTGGCT	1600
CTGGCGGGTG	GGGGTCAAGC	TGCCAATGCA	CTGGCCTTTG	GGAACAGCTG	1650
GCAAGAGAG	ACGAGGCCCC	GCTGTGGAGC	AACTGAACCG	GGTGAAGTGC	1700
CCAAGCTGGA	CTCCCTGGTG	GCCCAGCAGC	TGCAGAGGCA	GAATGAGTGT	1750
GGAATCCTTG	CCGACCCCA	CGGGCCCTTC	CGGGAGTGCC	ATAGCAAGCT	1800
GGAACCCCAAG	GGTGGCCTGC	GCGACTGTGT	CTATGACCGC	TGCCTGCTGC	1850
CAGGCCAGTC	TGGGCCACTG	TGTGACGCAC	TGGCCACCTA	TGCTGCTGCA	1900

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGCCAGGCTG	CTGGAGCCAC	AGTGACCCCC	TGGAGGAGTG	AAGAACCTTG	1950
CCCCTGAGC	TGCCCCCCCC	ACAGCCACTA	TGAGCGGTGT	TCCTACGGCT	2000
CCCCGCTGTC	CTGTGGAGAC	CTCCCAATGC	CCGGGGGCTG	TGGCTCAGAA	2050
TGCCATGAGG	GCTGGGTGTG	CGATCAGGGC	TTTGGGCTCA	GTGGTGAGTC	2100
CTGGCTGCCC	CTGGCTCTCT	GTGGCTGCGT	ACACCAAGGC	ACCTACCACC	2150
CACCAAGCCA	GACCTTCTAC	CCTGGCCCCG	GATGGAATTC	CCTTTGCCAC	2200
TGCCAGGAGG	GCGGCTGTGT	GTCTGTGTAG	TCCTCCAGCT	GCGGACCGCA	2250
CGAGGCTGTC	CAGCCTCCCG	GTGGCAGCTT	GGGTGTGTGT	GCGGTGGGCT	2300
CTAGCAGCTG	CGAGGCGTCA	GGAGACCCCC	ACTACACCAC	CTTCGATGGC	2350
CGGCGGTTCC	ACTTCATGGG	CACCTGCGTG	TATGTGCTGG	CTCAGACCTG	2400
CGGCAACCGG	CCTGGGCTGTC	ATCGGTTTGC	CGTCTGTGAG	GAGAACGTGG	2450
CCTGGGGTAA	TGGGCGAGTC	AGTGTGACCA	GGGTGATCAC	GGTCCAGGTG	2500
GCPAACTTCA	CCCTGGGGGT	GGAGCAGACA	CAGTGAAGG	TCACGGTGAA	2550
CGGTGTGGAC	ATGAAGCTGC	CGGTGGTGCT	GGCAACGGC	CAGATCCGTG	2600
CCTCCCAAGCA	TGGTTCAGAT	GTGTGTATTC	AGACCGACTT	CGGCTGCGT	2650
GTGGGCTTAC	ACCTGTGTGA	CTATGTGCGG	GTACCGTCC	CCGGAAACTA	2700
CTACCAGCAG	ATGTGTGGCC	TGTGTGCGAA	CTACAACGGC	GACCCCAAGG	2750
ATGACTTCCA	GAAGCCCAAT	GGTCTACAGG	CAGGCAACGC	CAATGAGTTC	2800
GGCACTCTCT	GGGAGGAGGT	GGTGGCCGAC	TCTCCCTGCC	TGCGGCCCCAC	2850
CCCTTGGCCCG	CCGGGGAGCG	AGGACTGTAT	CCCCAGCCAC	AAGTGTCTCT	2900
CCGAGCTGGA	GAAGAAGTAT	CAGAAGGAGG	AGTCTGTGG	GCTCCTCTCC	2950
AGCCCCACAG	GGCACTGTCT	CTCCGTGCCAC	AAGTGGGTGG	ATCCCCAGGG	3000
TCCCTTGAAA	GATTGCATCT	TTGATCTCTG	CCTGGGTGGT	GGGAACCTGA	3050
GCATTCTCTG	CAGCAACATC	CATGCCATAG	TGATGTCTTG	CCAGGCGGCT	3100
GGAGGCGACG	TGGAGCCCTG	GAGGACTGAA	ACTTCTGTCT	CCATGGAGTG	3150
CCCTCCGATC	AGTCACTACG	AGCTCTGTGC	GGACACCTGC	TCCCTGGGCT	3200
GCTCAGCTCT	CAGTGCCCTT	CCACAGTGCC	AGGATGGGTG	TGCTGAG	3247



【配列番号5】

配列番号：5

配列の長さ：3661

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTATGTGCGG	GTCACCGTCC	CCGAAACTA	CTACCAGCAG	ATGTGTGGCC	50
TGTGTGGGAA	CTACAACGGC	GACCCCAAGG	ATGACTTCCA	GAAGCCCAAT	100
GGCTCACAGG	CAGGCAACGC	CAATGAGTTC	GGCAACTCCT	GGCAGGAGGT	150
GGTGCCCCAC	TCTCCCTGCC	TGCGGCCAC	CCCTTGCCCG	CCGGGGAGCG	200
AGGACTGTAT	CCCCAGCCAC	AAGTGTCTTC	CCGAGCTGGA	GAAGAAGTAT	250
CAGAAGGAGG	AGTTCTGTGG	GCTCCTCTCC	AGCCCCACAG	GGCCACTGTC	300
CTCCTGCCAC	AAGCTGGTGG	ATCCCCAGGG	TCCCTTGAAA	GATTGCATCT	350
TTGATCTCTG	CCTGGGTGGT	GGGACCTGCA	GCAATCTCTG	CAGCAACATC	400
CATGCTACCG	TGAGTGCTTG	CCAGGCGGCT	GGAGGCCACG	TGGAGCCCTG	450
GAGGACTGAA	ACTTTCTGTC	CCATGGAGTG	CCCTCCGAC	AGTCACTACG	500
AGCTCTGTGC	GGACACCTGC	TCCCTGGGCT	GCTCAGCTCT	CAGTGGCCCT	550
CCACAGTGCC	AGGATGGGTG	TGCTGAGGCC	TGCCAGTGTG	ACTCCGGCTT	600
CCTCTACAAT	GGCCPAGGCT	GCGTGCCCAT	CCAGCAATGC	GGCTGCTACC	650
ACAATGGTGT	CTACTATGAG	CCGACCTAGA	CAGTCTCAT	TGACAACTGT	700
CGGCAGCAGT	GCACGTGCCA	TGCGCGTAAA	GGCATGGTGT	GCCAGGAACA	750
CACTGTCAAG	CCGGGGCAGG	TGTGCCAGCC	CTCCGGAGGC	ATCCTGAGCT	800
GCGTCACCAA	AGACCCGTGC	CACGGCGTGA	CATGCGGCCC	ACAGGAGACA	850
TGCAAGGAGC	AGGGTGGCCA	GGCGTGTGTC	CTGCCCACT	ATGAGGCCAC	900
GTGCTGGCTG	TGGGGCGACC	CACACTACCA	CTCCTTOGAT	GGCCGGAGT	950
TTGACTTCCA	GGGCACCTGT	AACTATGTGC	TGGCACAAC	TGGCTGCCCG	1000
GGGGTCAGCA	CCCAGGGCCT	GACACCCCTC	ACCGTCACCA	CCPAGAACCA	1050
GAACCGGGGC	AACCCCTGCTG	TGTCTTACGT	GAGAGTCGTC	ACCGTGGCTG	1100
CCCTCGGCAC	CAACATCTCC	ATCCACPAAG	ACGAGATCGG	CAAAGTCCGG	1150
GTGAACGGTG	TGCTCACAGC	CTTGCTGTTC	TCTGTGSCCG	ACGGGCGGAT	1200
TTCACTGACC	CAGGGTGCAT	CGAAGGCACT	GCTGGTGGCT	GACTTTGGAC	1250
TGCAAGTCAG	CTATGACTGG	AACTGGGGGG	TAGACGTGAC	GCTGCCCPAG	1300
AGCTATCATG	GCGCAGTGTG	CGGGCTCTGC	GGTAACATGG	ACCGCAACCC	1350
CAACAATGAC	CAGGTCTTCC	CTAATGGCAC	ACTGGCTCCC	TCCATACCCA	1400
TCTGGGGCGG	CAGCTGGCGA	GCCCCAGGCT	GGGACCCACT	GTGTTGGGAC	1450
GAATGTGCGG	GGTCTTGCCC	AACGTGCCCT	GAGGACCGGT	TGGAGCAGTA	1500
CGAGGGCCCT	GGTCTCTGCG	GACCCCTGGC	CCCCGGCACA	GGGGGCCCCCT	1550
TCACCACTTG	CCATGTCTAT	GTGCCACCTG	AGAGCTTCTT	CAAGGGCTGT	1600
GTTCGTGACG	TCTGCAATGG	TGGTGGGGAC	CGTGACATTC	TTTGCAAGGC	1650
TCTGGCTTCC	TATGTGGCCG	CCTGCCAGGC	TGCTGGGGTT	GTCAATCGAG	1700
ACTGGCGGCC	ACAGGTGGCC	TGTGAGTCA	CCTGCCCGCA	AAACAGCCAC	1750
TATGAGGTCT	GTGGGCCACC	CTGCCCGGCC	AGCTGTCCGT	CCCCTGCACC	1800
CCTTACGACG	CCAGCCGTAT	GTGAGGGCCC	CTGTGTGAG	GGCTGCCAGT	1850
GCGACGCGCG	TTTGTGTGTA	AGTGCTGACC	GCTGTGTTC	CCTCAACAC	1900

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGCTGGGGCT	GCTGGGCCAA	TGGCACCTAC	CACGAGGCGG	GCAGTGAGTT	1950
TTGGGCTGAT	GGCACCTGCT	CCCAGTGGTG	TGGCTGGGGG	CCTGGGGGTG	2000
GCTGGCTGGT	CTGCACACCT	GCCAGCTGTG	GGCTGGGTGA	AGTGTGTGGC	2050
CTCTGGCCAT	CCGGCCAGCA	CGGCTGCCAG	CCCGTCAGCA	CAGCTCAGTG	2100
CCAGGCGTGG	GGTGACCCCC	ATTACGTCAC	TCTGGATGGG	CACCGATTCA	2150
ATTTCCAAAG	CACCTGGGAG	TACCTGCTGA	GTGCACCTTG	CCACGGACCA	2200
CCCTTGGGGG	CTGAGAACTT	CACTGTCACT	GTAGCCAAATG	AGCACCGGGG	2250
CAGCCAGGCT	GTCAGCTACA	CCCGCAGTGT	CACCTTGCAA	ATCTACAACC	2300
ACAGGCTGAC	ACTGAGTGCC	CGGTGGCCCC	GGAGGCTACA	GGTGGACGGC	2350
GTGTTCGTCA	CTCTGCCCTT	CCAGCTGGAC	TGGTCTCTGC	AGGCACACCT	2400
GAGGGGCGCC	GACGTGGTGG	TGACCAACAC	CTCAGGGCTC	TGGCTGGCTT	2450
TGACGGGGGA	CAGCTTCGTG	CGCCTGGCGG	TGGCGGGGGC	GTAAGGGGGC	2500
TCTCTGTGTG	GCTTATGCGG	GAACTACAC	CAGGACCCCG	CAGACGACCT	2550
GAAGGGGGTG	GGGGGGAAGC	CCGCCGGATG	GCAGGTGGGC	GGGGCCAGG	2600
GCTGGGGGGA	ATGTGTGTCC	AAGCCATGCC	CGTGGCGGTG	CACCCACAG	2650
CAGCAAGAGT	CCTTGGGCGG	CCCGACGGCC	TGGGGGTGA	TCTCCGCCAC	2700
CGACGGGCGG	CTGGCGCCCT	GCCACGGGCT	TGTGGCGCCC	GCGCAGTACT	2750
TCCAGGGGTG	CTTGCTGGAC	GCCTGCCAAG	TTCAGGGCCA	TCTCGAGGAC	2800
CTCTGTCTTG	CAGTGGCCAC	CTACGTGGCA	GCCTGTCAAG	CGCTGGGGCC	2850
CCAGCTCCGC	GAGTGGAGGC	GGCCGGACTT	CTGTCCCTTC	CAGTGCCTTG	2900
CCCACAGCCA	CTACGAGCTC	TGCGGTGACT	CCTGTCTCTG	GAGCTGCCCC	2950
AGCCTGTCCG	CACCGAGGG	CTGTGAGTCG	GCCTGCGGTG	AAGGCTGTGT	3000
CTGCCATGCT	GCTTTCGTGC	TCAGTGGTGA	CACGTGTGTA	CCTGTGGGGC	3050
AGTGTGGCTG	CCTCCACGAT	GACCGTACT	ACCCACTGGG	CCAGACCTTC	3100
TACCCCTGGC	CTGGGTGTGA	TTCCCTTTTC	CGTGGCGGG	AGGGCGGTGA	3150
GGTGTCTGT	GAGCCCTCCA	GCTGGCGGCC	GCATGACACC	TGCCGGGCAT	3200
CCGGTGGCAG	CTTGGGCTGC	GTGGCCGTGG	GCTCTACCC	CTGCCAGGGC	3250
TGCGGAGATC	CCCACTACAC	CACCTTCGAT	GGCGGCGGCT	TGCACTTCAT	3300
GGGCACCTGC	GIGTATGTGC	TGGCTCAGAC	CTGGGSCACC	CGGCTGGGCC	3350
TACATCGGTT	TGCGGTCTTG	CAGGAGAACG	TGGGCTGGGG	TAATGGGGCA	3400
GTCAGTGTGA	CCAGGGTGT	CACGGTCCAG	GTGGCAAACT	TCAACCTGGG	3450
GCTGGAGCAG	AGACAGTGG	AGGTCAAGGT	GAACGGTGTG	GACATGAAGC	3500
TGCGCGTGST	GCTGGCCAAC	GGCCAGATCC	GTGGCTCCCA	GCATGGTTCA	3550
GATGTGTGTA	TTGAGACCG	CTTGGGCGTG	CGTGTGGGCT	AGCACCTTGT	3600
GTACTATGTG	CGGGTCACCG	TCCCTGCAAA	CTACTACCAG	CTGATGTGTG	3650
GCCTGTGTGG	G				3661

【配列番号6】

配列番号：6

配列の長さ：7824

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
gccccccgat	ccCTGCAGCC	ATGGGTGCCC	TATGCAGCTG	GTGGATACTC	50
		MetGlyAlaL	euTrpSerTr	pTrpIleLeu	
TGGGCTGCAG	CAACCTCCT	GTGGGGATTG	ACCCAGGAGG	CTTCAGTGGA	100
TrpAlaGlyA	laThrLeuLe	uTrpGlyLeu	ThrGlnGluA	laSerValAs	
CCTCAAGAAC	ACTGGCAGAG	AGGAATTCCT	CACAGCCTTC	CTGCAGAACT	150
pLeuLysAsn	ThrGlyArgG	luGluPheLe	uThrAlaPhe	LeuGlnAsnT	
ATCAGCTGGC	CTACAGCAAG	GCCTACCCCC	GCCTCCTTAT	CTCCAGTCTG	200
yrGlnLeuAl	aTyrSerLys	AlaTyrProA	rgLeuLeuIl	eSerSerLeu	
TCAGAGAGCC	CCGCTTCAGT	CTCCATCCTC	AGCCAGGCAG	ACAACACCTC	250
SerGluSerP	roAlaSerVa	lSerIleLeu	SerGlnAlaA	spAsnThrSe	
AAAGAAGGTC	ACAGTGAGGC	CCGGGGAGTC	GGTCATGGTC	AACATCAGTG	300
rLysLysVal	ThrValArgP	roGlyGluSe	rValMetVal	AsnIleSerA	
CCAGGCTGA	GATGATAGGC	AGCAAGATCT	TCCAGCATGC	GGTGGTGATC	350
laLysAlaGl	uMetIleGly	SerLysIleP	heGlnHisAl	aValValIle	
CATTCTGACT	ATGCCATCTC	TGTGCAGGCA	CTAAATGCCA	AGCCTGACAC	400
HisSerAspT	yrAlaIleSe	rValGlnAla	LeuAsnAlaL	ysProAspTh	
AGCGGAGCTG	ACACTGCTGC	GGCCCATCCA	GGCCCTAGGC	ACCGAGTATT	450
rAlaGluLeu	ThrLeuLeuA	rgProIleGl	nAlaLeuGly	ThrGluTyrP	
TGTGTCTCAC	ACCCCCCGGC	ACCTCAGCCA	GGAATGTCAA	GGAGTTTGCC	500
heValLeuTh	rProProGly	ThrSerAlaA	rgAsnValLy	sGluPheAla	
GTGGTGGCCG	GTGCGGCAGG	TGCCTCGGTC	AGTGTACGGC	TGAAGGGGTC	550
ValValAlaG	lyAlaAlaGl	yAlaSerVal	SerValThrL	euLysGlySe	
AGTGACATTC	ATGGCAAGT	TCTATCCAGC	AGGCGATGTC	CTAAGAGTGA	600
rValThrPhe	AsnGlyLysP	heTyrProAl	aGlyAspVal	LeuArgValT	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTCTACAGCC	CTACAATGTG	GCCCAGCTAC	AGAGCTCAGT	GGATCTCTCG	650
hrLeuGlnPr	oTyrAsnVal	AlaGlnLeuG	lnSerSerVa	lAspLeuSer	
GGGTCAAAGG	TCACAGCTAG	TAGCCCCGTG	GCTGTCTCT	CTGCCCACAG	700
GlySerLysV	alThrAlaSe	rSerProVal	AlaValLeuS	erGlyHisSe	
CTGTGCGCAG	AAACATACGA	CCTGCAACCA	TGTGGTTGAG	CAGCTGCTAC	750
rCysAlaGln	LysHisThrT	hrCysAsnFi	sValValGlu	GlnLeuLeuP	
CCACGTCTGC	CTGGGGCACC	CACTATGTAG	TACCCACGCT	GGCCTCCCAA	800
roThrSerAl	aTrpGlyThr	HisTyrValV	alProThrLe	uAlaSerGln	
TCTCGCTATG	ATTGGCCCTT	CGTTGTGGCC	AGCCAGGCCA	CAAAGCTGAC	850
SerArgTyrA	spLeuAlaPh	eValValAla	SerGlnAlaT	hrLysLeuTh	
CTACAACCAT	GGGGGTATCA	CTGGCTCCCG	TGGGCTCCAG	GCAGGTGATG	900
rTyrAsnHis	GlyGlyIleT	hrGlySerAr	gGlyLeuGln	AlaGlyAspV	
TGGTAGAGTT	TGAGGTCCGG	CCATCCTGGC	CACTCTACCT	GTCTGCAAAAT	950
alValGluPh	eGluValArg	ProSerTrpP	roLeuTyrLe	uSerAlaAsn	
GTTGGCATCC	AGGTCTGTGT	GTTTGGCACA	GGTGCCATAA	GGAATGAAGT	1000
ValGlyIleG	lnValLeuLe	uPheGlyThr	GlyAlaIleA	rgAsnGluVa	
GACTTATGAC	CCCTACCTGG	TCCTGATCCC	AGATGTGGCG	GCCTACTGCC	1050
lThrTyrAsp	ProTyrLeuV	alLeuIlePr	oAspValAla	AlaTyrCysP	
CAGCCTATGT	GGTCAAGAGT	GTACCAGGCT	GTCAGGGCGT	GGCCCTGGTA	1100
roAlaTyrVa	lValLysSer	ValProGlyC	ysGluGlyVa	lAlaLeuVal	
GTGGCACAGA	CGAAGGCTAT	CAGCGGGCTG	ACCATAGATG	GGCATGCACT	1150
ValAlaGlnT	hrLysAlaIl	eSerGlyLeu	ThrIleAspG	lyHisAlaVa	
GGGGGCCAAG	CTCACCTGGG	AGGCTGTGCC	AGGCAGTGAG	TTCTCGTATG	1200
lGlyAlaLys	LeuThrTrpG	luAlaValPr	cGlySerGlu	PheSerTyrA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTGAAGTGG	GCTCGGCACA	GCTGACATGA	TCCACACGGC	CGAGGCCACC	1250
laGluValGl	uLeuGlyThr	AlaAspMetI	leHisThrAl	aGluAlaThr	
ACCAACTTGG	GACTGCTCAC	CTTCGGGCTG	GCCAAGGCTA	TAGGCTACGC	1300
ThrAsnLeuG	lyLeuLeuTh	rPheGlyLeu	AlaLysAlaI	leGlyTyrAl	
AACAGCTGCT	GATTGGGGCC	GCACTGTACT	GTCCCCAGTG	GAGCCCTCCT	1350
aThrAlaAla	AspCysGlyA	rgThrValLe	uSerProVal	GluProSerC	
GCGAAGGCAT	GCAGTGGCCA	GCCGGGCGAG	GCTGCCAGGT	GTTAGCGGGG	1400
ysGluGlyMe	tGlnCysAla	AlaGlyGlnA	rgCysGlnVa	lValGlyGly	
AAGGCGGGGT	GTGTGGCGGA	GTCCACCGCT	GTCTGCCGGC	CCCAGGGCGA	1450
LysAlaGlyC	ysValAlaGl	uSerThrAla	ValCysArgA	laGlnGlyAs	
CCCCATTAC	ACCACCTTGG	ACGGCCGTCG	CTACGACATG	ATGGGCACCT	1500
pProHisTyr	ThrThrPheA	spGlyArgAr	gTyrAspMet	MetGlyThrC	
GTTCGTACAC	GATGGTGGAG	CTGTGCAGCG	AGCAAGACAC	CCTGCCCGCC	1550
ysSerTyrTh	rMetValGlu	LeuCysSerG	luAspAspTh	rLeuProAla	
TTCAGCGTGG	AGGCCAAGAA	CGAGCACCGG	GCCAGCGGCC	GCGTCTCCTA	1600
PheSerValG	luAlaLysAs	nGluHisArg	GlySerArgA	rgValSerTy	
CGTGGGCCTC	GTCACTGTGC	GCGCCTACAG	CCACTCTGTG	TCGCTGACCC	1650
rValGlyLeu	ValThrValA	rgAlaTyrSe	rHisSerVal	SerLeuThrA	
GCGGTGAAGT	TGGCTTCGTC	CTGGTTGACA	ACCAGCGCTC	GCGCCTGCCA	1700
rgGlyGluVa	lGlyPheVal	LeuValAspA	snGlnArgSe	rArgLeuPro	
GTCTCCCTGA	GTGAGGGTCG	CCTGCGTGTG	TACCAGAGCG	GACCACGGGC	1750
ValSerLeuS	erGluGlyAr	gLeuArgVal	TyrGlnSerG	lyProArgAl	
CGTGGTGGAG	CTGGTCTTTG	GGCTGGTGGT	CACTTATGAC	TGGGACTGCC	1800
aValValGlu	LeuValPheG	lyLeuValVa	lThrTyrAsp	TrpAspCysG	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AGCTGGCACT	CAGCCTGCCT	GCACGCTTCC	AAGACCAGGT	GTGCGGGCTG	1850
lnLeuAlaLe	uSerLeuPro	AlaArgPheG	lnAspGlnVa	lCysGlyLeu	
TGTGGCAACT	ATAATGGTGA	CCCAGCAGAC	GACTTCCTCA	CGCCTGACGG	1900
CysGlyAsnT	yrAsnGlyAs	pProAlaAsp	AspPheLeuT	hrProAspGl	
GGCTCTGGCT	CCTGACGCTG	TGGAGTTCCG	AAGTAGCTGG	AAGCTGGCATG	1950
yAlaLeuAla	ProAspAlaV	alGluPheAl	aSerSerTrp	LysLeuAspA	
ATGGGGACTA	CCTGTGTGAG	GATGGCTGCC	AGAACAACCTG	TCCCGCCTGC	2000
spGlyAspTy	rLeuCysGlu	AspGlyCysG	lnAsnAsnC	sProAlaCys	
ACCCGAGGCC	AGGCCCAACA	CTATGAGGGC	GACCGACTCT	GTGGCATGCT	2050
ThrProGlyG	lnAlaGlnHi	sTyrGluGly	AspArgLeuC	ysGlyMetLe	
GACCAAGCTC	GATGGCCCTT	TGGCTGTCTG	CCATGACACC	CTGGACCCCA	2100
uThrLysLeu	AspGlyProP	heAlaValCy	sHisAspThr	LeuAspProA	
GGCCCTTCTT	GGAGCAGTGT	GTATATGACC	TGTGTGTGGT	CGGTGGGGAG	2150
rgProPheLe	uGluGlnCys	ValTyrAspL	euCysValVa	lGlyGlyGlu	
GGGCTCAGCC	TGTGGCGTGG	CCTCAGCGCC	TATGCCCAGG	CCTGTCTGGA	2200
ArgLeuSerL	euCysArgGl	yLeuSerAla	TyrAlaGlnA	laCysLeuGl	
GCTTGGCATC	TGGGTGGGGG	ACTGGAGATC	ACCAGCCPAC	TGCCCCCTGT	2250
uLeuGlyIle	SerValGlyA	spTrpArgSe	rProAlaAsn	CysProLeuS	
CCTGCCCTGC	CAACAGCCGC	TATGAGCTCT	GCGGCCCTGC	TTGCCCGACC	2300
erCysProAl	aAsnSerArg	TyrGluLeuC	ysGlyProAl	aCysProThr	
TCTTGCAACG	GGGCTGGGGC	GCCGTCCAAC	TGCTCCGGGC	GCCCTGCGGT	2350
SerCysAsnG	lyAlaAlaAl	aProSerAsn	CysSerGlyA	rgProCysVa	
GGAGGGCTGC	GTGTGCTTCC	CAGGCTTCGT	GGCCAGCGGC	GGCGCCTGCG	2400
lGluGlyCys	ValCysLeuP	roGlyPheVa	lAlaSerGly	GlyAlaCysV	



10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGCCGGCCTC	GTCGTGTGGC	TGCACCTTCC	AGGGTCTCCA	GCTCGCTCCG	2450
alProAlaSe	rSerCysGly	CysThrPheG	lnGlyLeuGl	nLeuAlaPro	
GGCCAGGAAG	TGTGGGCGGA	CGAGTTGTGC	CAAGGGGCT	GCACCTGCAA	2500
GlyGlnGluV	alTrpAlaAs	pGluLeuCys	GlnArgArgC	ysThrCysAs	
CGCGCCACC	CATCAGGTCA	CCTGCCGCGA	CAAGCAGAGC	TGCCCGGCGG	2550
nGlyAlaThr	HisGlnValT	hrCysArgAs	pLysGlnSer	CysProAlaG	
GTCAGCGCTG	CAGCGTCCAG	AACGGCCTCC	TGGCTGCTA	CCCCGATCCG	2600
lyGluArgCy	sSerValGln	AsnGlyLeuL	euGlyCysTy	rProAspArg	
TTCGGACCT	GCCAGGGGTC	CGGGGACCCA	CACTATGTGA	GCTTCGACGG	2650
PheGlyThrC	ysGlnGlySe	rGlyAspPro	HisTyrValS	erPheAspGl	
CCGGCGCTTC	GACTTCATGG	GCACCTGCAC	GTACCTGCTG	GTCGGCTCAT	2700
yArgArgPhe	AspPheMetG	lyThrCysTh	rTyrLeuLeu	ValGlySerC	
CGGGCCAGAA	CGCAGCGCTG	CCTGCCCTTCC	GGGTGCTGGT	GGAAAACGAG	2750
ysGlyGlnAs	nAlaAlaLeu	ProAlaPheA	rgValLeuVa	lGluAsnGlu	
CATCGGGCCA	GCCAGACTGT	GAGCTACAGG	CGCGCGGTGC	GGGTGGAGGC	2800
HisArgGlyS	erGlnThrVa	lSerTyrThr	ArgAlaValA	rgValGluAl	
CGCGGGGGTG	AAGGTGGCCG	TGCGCGGGGA	GTACCCCGGG	CAAGTGCTGG	2850
aArgGlyVal	LysValAlaV	alArgArgGl	uTyrProGly	GlnValLeuV	
TGGATGACGT	CCTTCAGTAT	CTGCCCTTCC	AAGCAGCAGA	TGGGCAGGTG	2900
alAspAspVa	lLeuGlnTyr	LeuProPheG	lnAlaAlaAs	pGlyGlnVal	
CAGGTGTTC	GACAGGGCAG	GGATGCCGTC	GRGCGCACGG	ACTTTGGCCT	2950
GlnValPheA	rgGlnGlyAr	gAspAlaVal	ValArgThra	spPheGlyLe	
GACTGTCACT	TATGACTGGA	ATGCACGAGT	GACTGCCAAG	GTGCCCAGCA	3000
uThrValThr	TyrAspTrpA	snAlaArgVa	lThrAlaLys	ValProSerS	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GCTATGCTGA	GGCCCTGTGT	GGACTCTGTG	GGAACCTCAA	CGGGGACCCA	3050
erTyrAlaGl	uAlaLeuCys	GlyLeuCysG	lyAsnPheAs	nGlyAspPro	
GCTGATGACC	TGGCTCTGCG	GGTGGGGGT	CAAGCTGCCA	ATGCACTGGC	3100
AlaAspAspL	euAlaLeuAr	gGlyGlyGly	GlnAlaAlaA	snAlaLeuAl	
CTTTGGGAAC	AGCTGGCAAG	AAGACACGAG	GCCCCGCTGT	GGAGCAACTG	3150
aPheGlyAsn	SerTrpGlnG	luGluThrAr	gProGlyCys	GlyAlaThrG	
AACCGGCTGA	CTGTCCCAAG	CTGGAATCCC	TGGTGGCCCA	GCAGCTGCAG	3200
luProGlyAs	pCysProLys	LeuAspSerL	euValAlaGl	nGlnLeuGln	
AGCAAGAATG	AGTGTGGAAT	CCTTGCCGAC	CCCAAGGGGC	CCTTCCGGGA	3250
SerLysAsnG	luCysGlyIl	eLeuAlaAsp	ProLysGlyP	roPheArgGl	
GTGCCATAGC	AAGCTGGACC	CCCAGGGTGC	CGTGGCGGAC	TGTGTCTATG	3300
uCysHisSer	LysLeuAspP	roGlnGlyAl	aValArgAsp	CysValTyrA	
ACCGCTGCCT	GCTGCCAGGC	CAGTCTGGGC	CACTGTGTGA	CGCACTGGCC	3350
spArgCysLe	uLeuProGly	GlnSerGlyP	roLeuCysAs	pAlaLeuAla	
ACCTATGCTG	CTGCATGCCA	GGCTGCTGGA	GCCACAGTGC	ACCCCTGGAG	3400
ThrTyrAlaA	laAlaCysGl	nAlaAlaGly	AlaThrValH	isProTrpAr	
GAGTGAAGAA	CTTTGCCCCAC	TGAGCTGCCC	ACCCACAGC	CACTATGAGG	3450
gSerGluGlu	LeuCysProL	euSerCysPr	oProHisSer	HisTyrGluA	
CGTGTTCCTA	CGGCTGCCCG	CTGTCTGTG	GAGACCTCCC	AGTGCCCGGG	3500
laCysSerTy	rGlyCysPro	LeuSerCysG	lyAspLeuPr	oValProGly	
GGCTGTGGCT	CAGATGCCA	TGAGGGCTGC	GTGTGGGATG	AGGGCTTTGC	3550
GlyCysGlyS	erGluCysHi	sGluGlyCys	ValCysAspG	luGlyPheAl	
GCTCAGTGGT	GAGTCTTGCC	TGCCCCCTGGC	CTCCTGTGGC	TGCGTACACC	3600
aLeuSerGly	GluSerCysL	euProLeuAl	aSerCysGly	CysValHisG	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AGGGCACCTA	CCACCCACCA	GGCCAGACCT	TCTACCOCTGG	CCCCCGCATGT	3650
lnGlyThrTy	rHisProPro	GlyGlnThrP	heTyrProGl	yProGlyCys	
GATTCOCTTT	GCCACTGCCA	GGAGGGCGGC	CTGGTGTCTT	GTGAGTCCTC	3700
AspSerLeuC	ysHisCysGl	nGluGlyGly	LeuValSerC	ysGluSerSe	
CAGCTGCGGA	CCGCACGAGG	CCTGCCAGCC	ATCCGGTGGC	AGCTTGGGCT	3750
rSerCysGly	ProHisGluA	laCysGlnPr	oSerGlyGly	SerLeuGlyC	
GTGTGCGCGT	GGGCTCTAGC	ACCTGCCAGG	CGTCAGGAGA	CCCCCACTAC	3800
ysValAlaVa	lGlySerSer	ThrCysGlnA	laSerGlyAs	pProHisTyr	
ACCACCTTCG	ATGGCCCGCG	CTTCGACTTC	ATGGGCAOCT	GCGTGTATGT	3850
ThrThrPheA	spGlyArgAr	gPheAspPhe	MetGlyThrC	ysValTyrVa	
GCTGGCTCAG	ACCTGGGSCA	CCCGGCGCTGG	CCTGCATCGG	TTTGCCGTCC	3900
lLeuAlaGln	ThrCysGlyT	hrArgProGl	yLeuHisArg	PheAlaValL	
TGCAGGAGAA	CGTGGCGCTGG	GGTAATGGGC	GAGTCAGTGT	GACCAGGGTG	3950
euGlnGluAs	nValAlaTrp	GlyAsnGlyA	rgValSerVa	lThrArgVal	
ATCACGGTCC	AGGTGGCAAA	CTTCACCCCTG	CGGCTGGAGC	AGAGACAGTG	4000
IleThrValG	lnValAlaAs	nPheThrLeu	ArgLeuGluC	lnArgGlnTr	
GAAGGTCACG	GTGAACGGTG	TGGACATGAA	GCTGCCCCGTG	GTGCTGGCCA	4050
pLysValThr	ValAsnGlyV	alAspMetLy	sLeuProVal	ValLeuAlaA	
ACGGCCAGAT	CCGTGCCCTCC	CAGCATGGTT	CAGATGTTGT	GATTGAGACC	4100
snGlyGlnIl	eArgAlaSer	GlnHisGlyS	erAspValVa	lIleGluThr	
GACTTCGGGC	TGCGTGTTGGC	CTACGACCTT	GTGTACTATG	TGCGGGTCAC	4150
AspPheGlyL	euArgValAl	aTyrAspLeu	ValTyrTyrV	alArgValTh	
CGTCCCCGGA	AACTACTACC	AGCAGATGTG	TGGCCTGTTT	GGGAATAACA	4200
rValProGly	AsnTyrTyrG	lnGlnMetCy	sGlyLeuCys	GlyAsnTyrA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACGGCGACCC	CAAGGATGAC	TTCCAGAAGC	CCAATGGCTC	ACAGGCAGCC	4250
snGlyAspPr	oLysAspAsp	PheGlnLysP	roAsnGlySe	rGlnAlaGly	
AACGCCAATG	AGTTCGGCAA	CTCCTGGGAG	GAGGTGGTGC	CCGACTCTCC	4300
AsnAlaAsnG	luPheGlyAs	nSerTrpGlu	GluValValP	roAspSerPr	
CTGCTGCCC	CCCACCCCTT	GCCCCCGGG	GAGCGAGGC	TGTATCCCCA	4350
oCysLeuPro	ProThrProC	ysProProGl	ySerGluAsp	CysIleProS	
GCCACAAGTG	TCCTCCCGAG	CTGGAGAAGA	AGTATCAGAA	GCAGGAGTTC	4400
erHisLysCy	sProProGlu	LeuGluLysL	ysTyrGlnLy	sGluGluPhe	
TGTGGGCTCC	TCTCCAGCCC	CACAGGGCCA	CTGTCTCTCT	GCCACAAGCT	4450
CysGlyLeuL	euSerSerPr	oThrGlyPro	LeuSerSerC	ysHisLysLe	
GGTGGATCCC	CAGGGTCCCT	TGAAAGATTG	CATCTTTGAT	CTCTGCCTGG	4500
uValAspPro	GlnGlyProL	euLysAspCy	sIlePheAsp	LeuCysLeuG	
GTGGTGGGAA	CCTGAGCATT	CTCTGCAGCA	ACATCCATGC	CTACGTGAGT	4550
lyGlyGlyAs	nLeuSerIle	LeuCysSerA	snIleHisAl	aTyrValSer	
GCTTGGCAGG	GGGCTGGAGG	CCACGTGGAG	CCCTGGAGGA	CTGAAACTTT	4600
AlaCysGlnA	laAlaGlyGl	yHisValGlu	ProTrpArgT	hrGluThrPh	
CTGTCCCATG	GAGTGCCCTC	CGAACAGTCA	CTACGAGCTC	TGTGCGGACA	4650
eCysProMet	GluCysProP	roAsnSerHi	sTyrGluLeu	CysAlaAspT	
CCTGCTCCCT	GGGCTGCTCA	GCTCTCAGTG	CCCCTCCACA	GTGCCAGGAT	4700
hrCysSerLe	uGlyCysSer	AlaLeuSerA	laProProGl	nCysGlnAsp	
GGGTGTGCTG	AGGGCTGCCA	GTGTGACTCC	GGCTTCCTCT	ACAATGGCCA	4750
GlyCysAlaG	luGlyCysGl	nCysAspSer	GlyPheLeuT	yrAsnGlyGl	
AGCCTGCGTG	CCCCTCCAGC	AATGCGGCTG	CTACCACAAT	GGTGTCTACT	4800
nAlaCysVal	ProIleGlnG	lnCysGlyCy	sTyrHisAsn	GlyValTyrT	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ATGAGCCCGA	GCAGACAGTC	CTCATTGACA	ACTGTGGGCA	GCAGTGCACG	4850
yrGluProGl	uGlnThrVal	LeuIleAspA	snCysArgGl	nGlnCysThr	
TGCCATGCCG	GTAAGGCAT	GGTGTGCCAG	GAACACAGCT	GCAAGCCGGG	4900
CysHisAlaG	lyLysGlyMe	tValCysGln	GluHisSerC	ysLysProGl	
GCAGGTGTGC	CAGCCCTCCG	GAGGCATCCT	GAGCTGGGTC	ACCAAGACCC	4950
yGlnValCys	GlnProSerG	lyGlyIleLe	uSerCysVal	ThrLysAspP	
CGTGCCACGG	CGTGACATGC	CGGCCACAGG	AGACATGCAA	GGAGCAGGGT	5000
roCysHisGl	yValThrCys	ArgProGlnG	luThrCysLy	sGluGlnGly	
GGCCAGGGCG	TGTGCCTGCC	CAACTATGAG	GCCACGTGCT	GGCTGTGGGG	5050
GlyGlnGlyV	alCysLeuPr	oAsnTyrGlu	AlaThrCysT	rpLeuTrpGl	
CGACCCACAC	TACCACTCCT	TCGATGGCCG	GAAGTTTGAC	TTCCAGGGCA	5100
yAspProHis	TyrHisSerP	heAspGlyAr	gLysPheAsp	PheGlnGlyT	
CCTGTAACTA	TGTGCTGGCA	ACAACCTGGT	GCCCGGGGGT	CAGCACCCAG	5150
hrCysAsnTy	rValLeuAla	ThrThrGlyC	ysProGlyVa	lSerThrGln	
GGCCTGACAC	CCTTCACCGT	CAGCACCAAG	AACCAGAACC	GGGGCAACCC	5200
GlyLeuThrP	roPheThrVa	lThrThrLys	AsnGlnAsnA	rgGlyAsnPr	
TGCTGTGTCC	TACGTGAGAG	TGCTCACCGT	GGCTGCCCTC	GGCACCAACA	5250
oAlaValSer	TyrValArgV	alValThrVa	lAlaAlaLeu	GlyThrAsnI	
TCTCCATCCA	CAAGCAGGAG	ATCGGCAAAG	TCCGGGTGAA	CGGTGTGCTC	5300
leSerIleHi	sLysAspGlu	IleGlyLysV	alArgValAs	nGlyValLeu	
ACAGCCTTGC	CTGTCTCTGT	GGCCGACGGG	CGGATTTGAG	TGACCCAGGG	5350
ThrAlaLeuP	roValSerVa	lAlaAspGly	ArgIleSerV	alThrGlnGl	
TGCATCGAAG	GCACTGCTGG	TGGGTGACTT	TGGACTGCAA	GTCAGCTATG	5400
yAlaSerLys	AlaLeuLeuV	alAlaAspPh	eGlyLeuGln	ValSerTyrA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACTGGAACCTG	GCGGGTAGAC	GTGACGCTGC	CCAGCAGCTA	TCATGGCGCA	5450
spTrpAsnTr	pArgValAsp	ValThrLeuP	roSerSerTy	rHisGlyAla	
GTGTGCGGGC	TCTGCGGTAA	CATGGACCGC	AACCCCAACA	ATGACCAGGT	5500
ValCysGlyL	euCysGlyAs	nMetAspArg	AsnProAsnA	snAspGlnVa	
CTTCCCTAAT	GGCACACTGG	CTCCCTCCAT	ACCCATCTGG	GGCGGCAGCT	5550
lPheProAsn	GlyThrLeuA	laProSerIl	eProIleTrp	GlyGlySerT	
GGCGAGCCCC	AGGCTGGGAC	CCACTGTGTT	GGGACGAATG	TGGGGGTCC	5600
rpArgAlaPr	cGlyTrpAsp	ProLeuCysT	rpAspGluCy	sArgGlySer	
TGCCCCAACGT	GCCCTGAGGA	CGGTTGGAG	CAGTACGAGG	GCCCTGGCTT	5650
CysProThrC	ysProGluAs	pArgLeuGlu	GlnTyrGluG	lyProGlyPh	
CTGGGGACCC	CTGGCCCCCG	GCACAGGGGG	CCCTTTCACC	ACCTGCCATG	5700
eCysGlyPro	LeuAlaProG	lyThrGlyGl	yProPheThr	ThrCysHisA	
CTCATGTGCC	ACCTGAGAGC	TTCTTCAAGG	GCTGTGTCT	GGACGTCTGC	5750
laHisValPr	oProGluSer	PhePheLysG	lyCysValle	uAspValCys	
ATGGGTGGTG	GGGACCGTGA	CATTCTTTGC	AAGGCTCTGG	CTTCCTATGT	5800
MetGlyGlyG	lyAspArgAs	pIleLeuCys	LysAlaLeuA	laSerTyrVa	
GGCGGCTTGC	CAGGCTGTGT	GGGTGTCTAT	CGAAGACTGG	CGGGCACAGG	5850
laAlaAlaCys	GlnAlaAlaG	lyValValIl	eGluAspTrp	ArgAlaGlnV	
TGGGTGTGA	GATCACTTGC	CCAGAAAACA	GCCACTATGA	GGTCTGTGGC	5900
alGlyCysGl	uIleThrCys	ProGluAsnS	erHisTyrGl	uValCysGly	
CCACCCCTGCC	CGGCCAGCTG	TCCGTCCCTT	GCACCCCTTA	CGACGCCAGC	5950
ProProCysP	roAlaSerCy	sProSerPro	AlaProLeuT	hrThrProAl	
CGTATGTGAG	GGCCCTGTGT	TGGAGGGCTG	CCAGTGGGAC	GCGGGTTTCG	6000
aValCysGlu	GlyProCysV	alGluGlyCy	sGlnCysAsp	AlaGlyPheV	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGTTAAGTGC	TGACCGCTGT	GTTCCCTCTCA	ACAACGGCTG	CGGCTGCTGG	6050
alLeuSerAl	aAspArgCys	ValProLeuA	snAsnGlyCy	sGlyCysTrp	
GCCAATGGCA	CCTACCACGA	GGCGGGCAGT	GAGTTTGGG	CTGATGGCAC	6100
AlaAsnGlyT	hrTyrHisGl	uAlaGlySer	GluPheTrpA	laAspGlyTh	
CTGCTCCCTAG	TGGTGTGGT	GCGGGGCTGG	GGGTGGCTCG	CTGGTCTGCA	6150
rCysSerGln	TrpCysArgC	ysGlyProGl	yGlyGlySer	LeuValCysT	
CACCTGCCAG	CTGTGGGCTG	GGTGAAGTGT	GTCGCCTCCT	GCCATCCGGC	6200
hrProAlaSe	rCysGlyLeu	GlyGluValC	ysGlyLeuLe	uProSerGly	
CAGCAGGGCT	GCCAGCCCGT	CAGCACAGCT	GAGTCCACG	CGTGGGGTGA	6250
GlnHisGlyC	ysGlnProVa	lSerThrAla	GluCysGlnA	laTrpGlyAs	
CCCCATTAC	GTCACCTGG	ATGGGCACCG	ATTCAATTTC	CAAGGCACCT	6300
pProHisTyr	ValThrLeuA	spGlyHisAr	gPheAsnPhe	GlnGlyThrC	
GCGAGTACCT	GCTGAGTGCA	COCTGCCACG	GACCACCCCT	GGGGGCTGAG	6350
ysGluTyrLe	uLeuSerAla	ProCysHisG	lyProProLe	uGlyAlaGlu	
AACTTCACCTG	TCACTGTAGC	CAATGAGCAC	CGGGGCAGCC	AGCCTGTACG	6400
AsnPheThrV	alThrValAl	aAsnGluHis	ArgGlySerG	lnAlaValSe	
CTACACCCGC	AGTGTACCC	TGCCAAATCTA	CAACCACAGC	CTGACACTGA	6450
rTyrThrArg	SerValThrL	euGlnIleTy	rAsnHisSer	LeuThrLeuS	
GTGCCCCGCTG	GCCCCGGAAG	CTACAGGTGG	ACGGCGTGTT	CGTCACTCTG	6500
erAlaArgTr	pProArgLys	LeuGlnValA	spGlyValPh	eValThrLeu	
CCCTTCACGC	TGGACTCGCT	CCTGCACGCA	CACCTGAGCG	GCGCCGACGT	6550
ProPheGlnL	euAspSerLe	uLeuHisAla	HisLeuSerG	lyAlaAspVa	
GGTGGTGACC	ACACCTCAG	GGCTCTCGCT	GGCTTTCGAC	GGGGACAGCT	6600
lValValThr	ThrThrSerG	lyLeuSerLe	uAlaPheAsp	GlyAspSerP	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TCGTGCGCCT	GCGCGTCCG	GCGGCGTACG	CGGGCTCTCT	CTGTGCCTTA	6650
heValArgLe	uArgValPro	AlaAlaTyrA	laGlySerLe	uCysGlyLeu	
TGCGGGAAGT	ACAACCAGGA	CCCCGCAGAC	GACCTGAAGG	CGGTGGGCGG	6700
CysGlyAsnT	yrAsnGlnAs	pProAlaAsp	AspLeuLysA	laValGlyGl	
GAAGCCCGCC	GGATGGCAGG	TGGGCGGGCG	CCAGGGCTGC	GGGGAATGTG	6750
yLysProAla	GlyTrpGlnV	alGlyGlyAl	aGlnGlyCys	GlyGluCysV	
TGTCCAAGCC	ATGCCCGTCC	CGGTGCACCC	CAGAGCAGCA	AGAGTCCTTC	6800
alSerLysPr	cCysProSer	ProCysThrP	roGluGlnGl	nGluSerPhe	
GGCGCCCCGG	ACGGCTGGGG	CGTGATCTCC	GCCACCGACG	GCCCCGCTGG	6850
GlyGlyProA	spAlaCysGl	yValIleSer	AlaThrAspG	lyProLeuAl	
GCCCTGCCAC	GGCCTTGTC	CGCCCGGCGA	GTACTTCCAG	GGCTGCTTGC	6900
aProCysHis	GlyLeuValP	roProAlaGl	nTyrPheGln	GlyCysLeuL	
TGGACGCCTG	CCAAGTTCAG	GCCCATCCTG	GAGGCTCTTG	TCTTGCAGTG	6950
euAspAlaCy	sGlnValGln	GlyHisProG	lyGlyLeuCy	sProAlaVal	
GCCACCTACG	TGGCAGCCTG	TCAGGCGGCT	GGGGGCCAGC	TCCGCGAGTG	7000
AlaThrTyrV	alAlaAlaCy	sGlnAlaAla	GlyAlaGlnL	euArgGluTr	
GAGGCGGGCG	GACTTCGTG	CCTTCCAGTG	CCCTGCCCCAC	AGCCACTACG	7050
pArgArgPro	AspPheCysP	roPheGlnCy	sProAlaHis	SerHisTyrG	
AGCTCTGCGG	TGACTTCCTGT	CCTGGGAGCT	GCCCGAGCCT	GTCGGCACCC	7100
luLeuCysGl	yAspSerCys	ProGlySerC	ysProSerLe	uSerAlaPro	
GAGGGCTGTG	AGTCGGCCTG	CCGTGAAGGC	TGTGTCTGGG	ATGCTGGCTT	7150
GluGlyCysG	luSerAlaCy	sArgGluGly	CysValCysA	spAlaGlyPh	
CGTGCTCAGT	GGTGACAGT	GTGTACCTGT	GGGCCAGTGT	GGCTGCCTCC	7200
eValLeuSer	GlyAspThrC	ysValProVa	lGlyGlnCys	GlyCysLeuH	



10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACGATGACCG	CTACTACCCA	CTGGGCCAGA	CCTTCTACCC	TGGCCCTGGG	7250
isAspAspAr	gTyrTyrPro	LeuGlyGlnT	hrPheTyrPr	oGlyProGly	
TGTGATTCCC	TTTGCCGCTG	CCGGGAGGGC	GGTGAGGTGT	CCTGTGAGCC	7300
CysAspSerL	euCysArgCy	sArgGluGly	GlyGluValS	erCysGluPr	
CTCCAGCTGC	GGCCCGCATG	AGACCTGCCG	GCCATCCGGT	GGCAGCTTGG	7350
oSerSerCys	GlyProHisG	luThrCysAr	gProSerGly	GlySerLeuG	
GCTGGGTGGC	CGTGGGCTCT	ACCACTGCC	AGGGGTGGGG	AGATCCCCAC	7400
lyCysValAl	aValGlySer	ThrThrCysG	lnAlaSerGl	yAspProHis	
TACACCACCT	TCGATGGCCG	CCGCTTCGAC	TTCATGGGCA	CCTGCGTGTA	7450
TyrThrThrP	heAspGlyAr	gArgPheAsp	PheMetGlyT	hrCysValTy	
TGTGCTGGCT	CAGACCTGGC	GCACCCGGCC	TGGCCTACAT	CGGTTTGGCG	7500
rValLeuAla	GlnThrCysG	lyThrArgPr	oGlyLeuHis	ArgPheAlaV	
TCCTGCAGGA	GAACGTGGCC	TGGGGTAATG	GGCGAGTCAG	TGTGACCAGG	7550
alLeuGlnGl	uAsnValAla	TrpGlyAsnG	lyArgValSe	rValThrArg	
GTGATCACGG	TCCAGGTGGC	AAACTTCACC	CTGGGGCTGG	AGCAGAGACA	7600
ValIleThrV	alGlnValAl	aAsnPheThr	LeuArgLeuG	luGlnArgGl	
GTGGTGGGTC	ACGGTGAACG	GTGTGGACAT	GAAGCTGCCC	GTGGTGCTGG	7650
nTrpLysVal	ThrValAsnG	lyValAspMe	tLysLeuPro	ValValLeuA	
CCAAAGGCCA	GATCCGTGCC	TCCAGCATG	GTTCAGATGT	TGTGATTGAG	7700
laAsnGlyGl	nIleArgAla	SerGlnHisG	lySerAspVa	lValIleGlu	
ACCGACTTCG	GCCTGGGTGT	GGCTACGCAC	CTTGTTGTA	ATGTGGGGGT	7750
ThrAspPheG	lyLeuArgVa	lAlaTyrAsp	LeuValTyrT	yrValArgVa	
CACCGTCCCT	GGAACTACT	ACCAGCTGAT	GTGTGGCCTG	TGTGGGgat	7800
lThrValPro	GlyAsnTyrT	yrGlnLeuMe	tCysGlyLeu	CysGlyGlyS	

10	20	30	40	50
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
ccactaotta ottaottaac otac				7824
er				

【配列番号 7】

配列番号： 7

配列の長さ： 1 6 3 8 2

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直線状

配列の種類： c D N A

配列

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTGCAGCCAT	GGGTGCCCTA	TGGAGCTGGT	GGATACTCTG	GGCTGGAGCA	50
Me	tGlyAlaLeu	TrpSerTrpT	rpIleLeuTr	pAlaGlyAla	
ACCCCTCCTGT	GGGGATTGAC	CCAGGAGGCT	TCAGTGGACC	TCAAGAACAC	100
ThrLeuLeuT	rpGlyLeuTh	rGlnGluAla	SerValAspL	euLysAsnTh	
TGGCAGAGAG	GAATTCCTCA	CAGCCTTCCT	GCAGAACTAT	CAGCTGGCCT	150
rGlyArgGlu	GluPheLeuT	hrAlaPheLe	uGlnAsnTyr	GlnLeuAlaT	
ACAGCAAGGC	CTACCCCGGC	CTCCTTATCT	CCAGTCTGTC	AGAGAGCCCC	200
yrSerLysAl	aTyrProArg	LeuLeuIleS	erSerLeuSe	rGluSerPro	
GCTTCAGTCT	CCATCCTCAG	CCAGGCAGAC	AACACCTCAA	AGAAGGTCAC	250
AlaSerValS	erIleLeuSe	rGlnAlaAsp	AsnThrSerL	ysLysValTh	
AGTGAGGCCC	GGGGAGTCGG	TCATGGTCAA	CATCAGTGCC	AAGGCTGAGA	300
rValArgPro	GlyGluSerV	alMetValAs	nIleSerAla	LysAlaGluM	
TGATAGGCAG	CAAGATCTTC	CAGCATGCGG	TGGTGATCCA	TTCTGACTAT	350
etIleGlySe	rLysIlePhe	GlnHisAlaV	alValIleHi	sSerAspTyr	
GCCAICTCTG	TGCAGGCACT	AAATGCCAAG	CCTGACACAG	CGGAGCTGAC	400
AlaIleSerV	alGlnAlaLe	uAsnAlaLys	ProAspThrA	laGluLeuTh	
ACTGCTGCGG	CCCATCCAGG	CCCTAGGCAC	CGAGTATTTT	GTGCTCACAC	450
rLeuLeuArg	ProIleGlnA	laLeuGlyTh	rGluTyrPhe	ValLeuThrP	
CCCCCGGCAC	CTCAGCCAGG	AATGTCAAGG	AGTTTGCCGT	GGTGGCCGGT	500
roProGlyTh	rSerAlaArg	AsnValLysG	luPheAlaVa	lValAlaGly	
GCCGCAGGTG	CCTCGGTCAG	TGTCACGCTG	AAGGGGTCAG	TGACATTCAA	550
AlaAlaGlyA	laSerValSe	rValThrLeu	LysGlySerV	alThrPheAs	
TGGCAAGTTC	TATCCAGCAG	GCGATGTCTT	AAGAGTGAAT	CTACAGCCCT	600
nGlyLysPhe	TyrProAlaG	lyAspValLe	uArgValThr	LeuGlnProT	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACAATGTGGC	CCAGCTACAG	AGCTCAGTGG	ATCTCTCGGG	GTCAAAGGTC	650
yrAsnValAl	aGlnLeuGln	SerSerValA	spLeuSerGl	ySerLysVal	
ACAGCTAGTA	GCCCCGTGGC	TGTCCTCTCT	GGCCACAGCT	GTGCGCAGAA	700
ThrAlaSerS	erProValAl	aValLeuSer	GlyHisSerC	ysAlaGlnLy	
ACATACGACC	TGCAACCATG	TGGTTGAGCA	GCTGCTACCC	ACGTCTGCCT	750
sHisThrThr	CysAsnHisV	alValGluGl	nLeuLeuPro	ThrSerAlaT	
GGGGCACCCA	CTATGTAGTA	CCCACGCTGG	CCTCCCAATC	TCGCTATGAT	800
rpGlyThrHi	sTyrValVal	ProThrLeuA	laSerGlnSe	rArgTyrAsp	
TTGGCCTTCG	TTGTGGCCAG	CCAGGCCACA	AAGCTGACCT	ACAACCATGG	850
LeuAlaPheV	alValAlaSe	rGlnAlaThr	LysLeuThrT	yrAsnHisGl	
GGGTATCACT	GGCTCCCGTG	GGCTCCAGGC	AGGTGATGTG	GTAGAGTTTG	900
yGlyIleThr	GlySerArgG	lyLeuGlnAl	aGlyAspVal	ValGluPheG	
AGGTCCGGGC	ATCCTGGCCA	CTCTACCTGT	CTGCAAATGT	GGGCATCCAG	950
luValArgPr	oSerTrpPro	LeuTyrLeuS	erAlaAsnVa	lGlyIleGln	
GTCTGTGTGT	TTGGCACAGG	TGCCATAAGG	AATGAAGTGA	CTTATGACCC	1000
ValLeuLeuP	heGlyThrGl	yAlaIleArg	AsnGluValT	hrTyrAspPr	
CTACCTGGTC	CTGATCCAG	ATGTGGCGGC	CTACTGCCCA	GCCTATGTGG	1050
cTyrLeuVal	LeuIleProA	spValAlaAl	aTyrCysPro	AlaTyrValV	
TCAAGAGTGT	ACCAGGCTGT	GAGGGCGTGG	CCCTGGTAGT	GGCACAGACG	1100
alLysSerVa	lProGlyCys	GluGlyValA	laLeuValVa	lAlaGlnThr	
AAGGCTATCA	GCGGGCTGAC	CATAGATGGG	CATGCAGTGG	GGGCCAAGCT	1150
LysAlaIleS	erGlyLeuTh	rIleAspGly	HisAlaValG	lyAlaLysLe	
CACCTGGGAG	GCTGTGCCAG	GCAGTGAGTT	CTCGTATGCT	GAAGTGGAGC	1200
uThrTrpGlu	AlaValProG	lySerGluPh	eSerTyrAla	GluValGluL	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TCGGCACAGC	TGACATGATC	CACACGGCCG	AGGCCACCAC	CAACTTGGGA	1250
euGlyThrAl	aAspMetIle	HisThrAlaG	luAlaThrTh	rAsnLeuGly	
CTGCTCACCT	TGGGGCTGGC	CAAGGCTATA	GGCTACGCAA	CAGCTGCTGA	1300
LeuLeuThrP	heGlyLeuAl	aLysAlaIle	GlyTyrAlaT	hrAlaAlaAs	
TTGGGGCCGG	ACTGTACTGT	CCCCAGTGGG	GCCCTCCTGC	GAAGGCATGC	1350
pCysGlyArg	ThrValLeuS	erProValGl	uProSerCys	GluGlyMetG	
AGTGCCGAGC	CGGGCAGCCG	TGCCAGGTGG	TAGGCGGGAA	GGCCGGGTGT	1400
lnCysAlaAl	aGlyGlnArg	CysGlnValV	alGlyGlyLy	sAlaGlyCys	
GTGGGGGAGT	CCACCGCTGT	CTGCGCGGCC	CAGGGCGACC	CCCATTACAC	1450
ValAlaGluS	erThrAlaVa	lCysArgAla	GlnGlyAspP	roHisTyrTh	
CACCTTCGAC	GGCCGTGGCT	ACGACATGAT	GGGCACCTGT	TCGTACACGA	1500
rThrPheAsp	GlyArgArgT	yrAspMetMe	tGlyThrCys	SerTyrThrM	
TGGTGGAGCT	GTGCAGCGAG	GACGACACCC	TGCCCGCCTT	CAGCGTGGAG	1550
etValGluLe	uCysSerGlu	AspAspThrL	euProAlaPh	eSerValGlu	
GCCAAGAACG	AGCACCGGGG	CAGCCGCGCG	GTCTCCTACG	TGGGCCTCGT	1600
AlaLysAsnG	luHisArgGl	ySerArgArg	ValSerTyrV	alGlyLeuVa	
CACTGTGGGC	GGCTACAGCC	ACTCTGTGTC	GCTGACCCGC	GGTGAAGTTG	1650
lThrValArg	AlaTyrSerH	isSerValSe	rLeuThrArg	GlyGluValG	
GCTTCGTCTT	GGTTGACAAC	CAGCGCTGGC	GGCTGCCAGT	CTCCCTGAGT	1700
lyPheValLe	uValAspAsn	GlnArgSerA	rgLeuProVa	lSerLeuSer	
GAGGGTGGCC	TGCGTGTGTA	CCAGAGCGGA	CCACGGGGCC	TGGTGGAGCT	1750
GluGlyArgL	euArgValTy	rGlnSerGly	ProArgAlaV	alValGluLe	
GGTCTTTGGG	CTGGTGGTCA	CTTATGACTG	GGACTGCCAG	CTGGCACTCA	1800
uValPheGly	LeuValValT	hrTyrAspTr	pAspCysGln	LeuAlaLeuS	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GCCTGCCTGC	ACGCTTCCAA	GACCAGGTGT	GCGGGCTGTG	TGCCAACTAT	1850
erLeuProAl	aArgPheGln	AspGlnValC	ysGlyLeuCy	sGlyAsnTyr	
AATGGTGACC	CAGCAGACGA	CTTCCTCAGC	CCTGACGGGG	CTCTGGCTCC	1900
AsnGlyAspP	roAlaAspAs	pPheLeuThr	ProAspGlyA	laLeuAlaPr	
TGACGCTGTG	GAGTTCCGAA	GTAGCTGGAA	GCTGGATGAT	GGGGACTACC	1950
oAspAlaVal	GluPheAlaS	erSerTrpLy	sLeuAspAsp	GlyAspTyrL	
TGTGTGAGGA	TGGCTGCCAG	AACAACCTGTC	CCGCCTGCAC	CCCAGGCCAG	2000
euCysGluAs	pGlyCysGln	AsnAsnCysP	roAlaCysTh	rProGlyGln	
GCCCAACACT	ATGAGGGCGA	CCGACTCTGT	GGCATGCTGA	CCAAGCTCGA	2050
AlaGlnHisT	yrGluGlyAs	pArgLeuCys	GlyMetLeuT	hrLysLeuAs	
TGGCCCCCTTC	GCTGTCTGCC	ATGACACCCT	GGACCCGAGG	CCCTTCTCTG	2100
pGlyProPhe	AlaValCysH	isAspThrLe	uAspProArg	ProPheLeuG	
AGCAGTGTGT	ATATGACCTG	TGTGTGGTCG	GTGGGGAGCG	GCTCAGCCTG	2150
luGlnCysVa	lTyrAspLeu	CysValValG	lyGlyGluAr	gLeuSerLeu	
TGCCGTGGCC	TCAGCGGCTA	TGCCCAGGCG	TGTCTGAGAC	TTGGCATCTC	2200
CysArgGlyL	euSerAlaTy	rAlaGlnAla	CysLeuGluL	euGlyIleSe	
GGTTGGGGAC	TGGAGATCAC	CAGCCAACTG	CCCCCTGTCC	TGCCCTGCCA	2250
rValGlyAsp	TrpArgSerP	roAlaAsnC	sProLeuSer	CysProAlaA	
ACAGCCGCTA	TCAGCTCTGC	GGCCCTGCTT	GCCCCACCTC	CTGCAACGGG	2300
snSerArgTy	rGluLeuCys	GlyProAlaC	ysProThrSe	rCysAsnGly	
GCTGCGGGCG	CGTCCAACTG	CTCCGGGGCG	CCCTGCGTGG	AGGGCTGGGT	2350
AlaAlaAlaP	roSerAsnC	sSerGlyArg	ProCysValG	luGlyCysVa	
GTGCCTCCCA	GGCTTCGTGG	CCAGCGGGCG	CGCCTGCGTG	CCGGCCTCGT	2400
lCysLeuPro	GlyPheValA	laSerGlyGl	yAlaCysVal	ProAlaSerS	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CGTGTGGCTG	CACCTTCCAG	GGTCTCCAGC	TCGCTCCGGG	CCAGGAAGTG	2450
erCysGlyCy	sThrPheGln	GlyLeuGlnL	euAlaProGl	yGlnGluVal	
TGGGCGGACG	AGTTGTGCCA	AAGGCGCTGC	ACCTGCAACG	GCGCCACCCA	2500
TrpAlaAspG	luLeuCysGl	nArgArgCys	ThrCysAsnG	lyAlaThrHi	
TCAGGTCACC	TGCCGCGACA	AGCAGAGCTG	CCCGCGGGGT	GAGCGCTGCA	2550
sGlnValThr	CysArgAspL	ysGlnSerCy	sProAlaGly	GluArgCyss	
GCGTCCAGAA	CGGCCTCCTG	GGCTGCTACC	CCGATCGCTT	CGGGACCTGC	2600
erValGlnAs	nGlyLeuLeu	GlyCysTyrP	roAspArgPh	eGlyThrCys	
CAGGSETCCG	GGGACCCACA	CTATGTGAGC	TTCGACGGCC	GCGCGTTCGA	2650
GlnGlySerG	lyAspProHi	sTyrValSer	PheAspGlyA	rgArgPheAs	
CTTCATGGGC	ACCTGCACGT	ACCTGCTGGT	CGGCTCATGC	GGCCAGAACG	2700
pPheMetGly	ThrCysThrT	yrLeuLeuVa	lGlySerCys	GlyGlnAsnA	
CAGCGCTGCC	TGCCCTCCGG	GTGCTGGTGG	AAAACGAGCA	TCGGGGCAGC	2750
laAlaLeuPr	oAlaPheArg	ValLeuValG	luAsnGluHi	sArgGlySer	
CAGACTGTGA	GCTACACCGG	CGCCGTGCGG	GTGGAGGCCC	GCGGGGTGAA	2800
GlnThrValS	erTyrThrAr	gAlaValArg	ValGluAlaA	rgGlyValLy	
GGTGGCCGTG	CGCCGGGAGT	ACCCCGGGCA	AGTGCTGGTG	GATGACGTCC	2850
sValAlaVal	ArgArgGluT	yrProGlyGl	nValLeuVal	AspAspValL	
TTCAGTATCT	GCCCTTCCAA	GCAGCAGATG	GCCAGGTGCA	GGTGTTCCTA	2900
euGlnTyrLe	uProPheGln	AlaAlaAspG	lyGlnValGl	nValPheArg	
CAGGGCAGGG	ATGCCGTCTG	GCGCACGGAC	TTTGGCTGTA	CTGTCACTTA	2950
GlnGlyArgA	spAlaValVa	lArgThrAsp	PheGlyLeuT	hrValThrTy	
TGACTGGAAT	GCAAGAGTGA	CTGCCAAGGT	GCCCAGCAGC	TATGCTGAGG	3000
rAspTrpAsn	AlaArgValT	hrAlaLysVa	lProSerSer	TyrAlaGluA	



10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCCTGTGTGG	ACTCTGTGGG	AACTTCAACG	GGGACCCAGC	TGATGACCTG	3050
laLeuCysGl	yLeuCysGly	AsnPheAsnG	lyAspProAl	aAspAspLeu	
GCTCTGCGGG	GTGGGGGTCA	AGCTGCCAAT	GCACTGGCCT	TTGGGACACG	3100
AlaLeuArgG	lyGlyGlyGl	nAlaAlaAsn	AlaLeuAlaP	heGlyAsnSe	
CTGGCAAGAA	GACACGAGGC	CCGGCTGTGG	AGCAACTGAA	CCGGGTGACT	3150
rTrpGlnGlu	GluThrArgP	roGlyCysGl	yAlaThrGlu	ProGlyAspC	
GTCCCAAGCT	GGACTCCCTG	GTGGCCCGAG	AGCTGCAGAG	CAAGPATGAG	3200
ysProLysLe	uAspSerLeu	ValAlaGlnG	lnLeuGlnSe	rLysAsnGlu	
TGTGCAATCC	TTGCCGACCC	CAAGGGGCCC	TTCCGGGAGT	GCCATAGCAA	3250
CysGlyIleL	euAlaAspPr	oLysGlyPro	PheArgGluC	ysHisSerLy	
GCTGGACCCC	CAGGGTGGCG	TGCGCGACTG	TGTCTATGAC	CGCTGCCTGC	3300
sLeuAspPro	GlnGlyAlaV	aArgAspCy	sValTyrAsp	ArgCysLeuL	
TGCCAGGCCA	GTCTGGGCCA	CTGTGTGACG	CACTGGCCAC	CTATGCTGCT	3350
euProGlyGl	nSerGlyPro	LeuCysAspA	laLeuAlaTh	rTyrAlaAla	
GCATGCCAGG	CTGCTGGAGC	CACAGTGCCAC	CCCTGGAGGA	GTGAAGAACT	3400
AlaCysGlnA	laAlaGlyAl	aThrValHis	ProTrpArgS	erGluGluLe	
TTGCCCACTG	AGCTGCCAC	CCCACAGCCA	CTATGAGGCG	TGTTCCCTACG	3450
uCysProLeu	SerCysProp	roHisSerHi	sTyrGluAla	CysSerTyrG	
GCTGCCCGCT	GTCTGTGGA	GACCTCCCAG	TGCCCGGGGG	CTGTGGCTCA	3500
lyCysProLe	uSerCysGly	AspLeuProV	alProGlyGl	yCysGlySer	
GAATGCCATG	AGGGCTGGGT	GTGGCATGAG	GGCTTTGGGC	TCAGTGGTGA	3550
GluCysHisG	luGlyCysVa	lCysAspGlu	GlyPheAlaL	euSerGlyGl	
GTCTGCCTG	CCCTGGCCT	CCTGTGGCTG	CGTACACCAG	GGCACCTACC	3600
uSerCysLeu	ProLeuAlaS	erCysGlyCy	sValHisGln	GlyThrTyrH	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACCCACCAGG	CCAGACCTTC	TACCCTGGCC	CCGGATGTGA	TTCCCTTTGC	3650
isProProGl	yGlnThrPhe	TyrProGlyP	roGlyCysAs	pSerLeuCys	
CACTGCCAGG	AGGGGGGGCT	GGTGTCTGT	GAGTCTTCCA	GCTGGGGACC	3700
HisCysGlnG	luGlyGlyLe	uValSerCys	GluSerSerS	erCysGlyPr	
GCACGAGGCC	TGCCAGCCAT	CCGGTGGCAG	CTTGGGCTGT	GTGGCGGTGG	3750
oHisGluAla	CysGlnProS	erGlyGlySe	rLeuGlyCys	ValAlaValG	
GCTCTAGCAC	CTGCCAGGCG	TCAGGAGACC	CCCACTACAC	CACCTTCGAT	3800
lySerSerTh	rCysGlnAla	SerGlyAspP	roHisTyrTh	rThrPheAsp	
GGCGCGCGCT	TCGACTTCAT	GGGCACCTGC	GTGTATGTGC	TGGCTCAGAC	3850
GlyArgArgP	heAspPheMa	tGlyThrCys	ValTyrValL	euAlaGlnTh	
CTGGCGCACC	CGGCCTGGCC	TGCATCGGTT	TGCCGTCTCTG	CAGGAGAACC	3900
rCysGlyThr	ArgProGlyL	euHisArgPh	eAlaValLeu	GlnGluAsnV	
TGGCCTGGGG	TAATGGGGCA	GTCAGTGTCG	CCAGGGTGAT	CACGGTCCAG	3950
alAlaTrpGl	yAsnGlyArg	ValSerValT	hrArgValIl	eThrValGln	
GTGGCAAACT	TCACCCTGCG	GCTGGAGCAG	AGACAGTGGG	AGGTCACGGT	4000
ValAlaAsnP	heThrLeuAr	gLeuGluGln	ArgGlnTrpL	ysValThrVa	
GAACGGTGTG	GACATGAAGC	TGCCCGTGGT	GCTGGCCAAC	GCCAGATCC	4050
lAsnGlyVal	AspMetLysL	euProValVa	lLeuAlaAsn	GlyGlnIleA	
GTGCCTCCCA	GCATGGTTCA	GATGTTGTGA	TTGAGACCGA	CTTCGGCCTG	4100
rgAlaSerGl	nHisGlySer	AspValValI	leGluThrAs	pPheGlyLeu	
CGTGTGGCCT	ACGACCTTGT	GTACTATGTG	CGGGTCACCG	TCCCCGGAAA	4150
ArgValAlaT	yrAspLeuVa	lTyrTyrVal	ArgValThrV	alProGlyAs	
CTACTACCAG	CAGATGTGTG	GCCTGTGTGG	GAAGTACAAC	GGCGACCCCA	4200
nTyrTyrGln	GlnMetCysG	lyLeuCysGl	yAsnTyrAsn	GlyAspProL	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AGGATGACTT	CCAGAAGCCC	AATGGCTCAC	AGGCAGGCAA	CGCCAATGAG	4250
ysAspAspPh	eGlnLysPro	AsnGlySerG	lnAlaGlyAs	nAlaAsnGlu	
TTCGGCAACT	CCTGGGAGGA	GGTGGTGCCC	GACTCTCCCT	GCCTGCCGCC	4300
PheGlyAsnS	erTrpGluGl	uValValPro	AspSerProC	ysLeuProPr	
CACCCCTTGC	CCGCGGGGGA	GCGAGGACTG	TATCCCCAGC	CACAAGTGTC	4350
oThrProCys	ProProGlyS	erGluAspCy	sIleProSer	HisLysCysP	
CTCCCGAGCT	GGAGAAGAAG	TATCAGAAGG	AGGAGTTCTG	TGGGCTCCTC	4400
roProGluLe	uGluLysLys	TyrGlnLysG	luGluPheCy	sGlyLeuLeu	
TCCAGCCCCA	CAGGGCCACT	GTCCTCCTGC	CACAAGCTGG	TGGATCCCCA	4450
SerSerProT	hrGlyProLe	uSerSerCys	HisLysLeuV	alAspProGl	
GGGTCCCTTG	AAAGATTGCA	TCTTTGATCT	CTGCCTGGGT	GGTGGGAACC	4500
nGlyProLeu	LysAspCysI	lePheAspLe	uCysLeuGly	GlyGlyAsnL	
TGAGCATTCT	CTGCAGCAAC	ATCCATGCCT	ACGTGAGTGC	TTGCCAGGCG	4550
euSerIleLe	uCysSerAsn	IleHisAlaT	yrValSerAl	aCysGlnAla	
GCTGGAGGCC	ACGTGGAGCC	CTGGAGGACT	GAACTTTCT	GTCCCATGGA	4600
AlaGlyGlyH	isValGluPr	oTrpArgThr	GluThrPheC	ysProMetGl	
GTGCCCTCCG	AACAGTCACT	ACGAGCTCTG	TGCGGACACC	TGCTCCCTGG	4650
uCysProPro	AsnSerHist	yrGluLeuCy	sAlaAspThr	CysSerLeuG	
GCTGCTCAGC	TCTCAGTGCC	CCTCCACAGT	GCCAGGATGG	GTGTGCTGAG	4700
lyCysSerAl	aLeuSerAla	ProProGlnC	ysGlnAspGl	yCysAlaGlu	
GGCTGCCAGT	GTGACTCCGG	CTTCCTCTAC	AATGGCCAAG	CCTGCGTGCC	4750
GlyCysGlnC	ysAspSerGl	yPheLeuTyr	AsnGlyGlnA	laCysValPr	
CATCCAGCAA	TGCGGCTGCT	ACCACAATGG	TGTCTACTAT	GAGCCGGAGC	4800
oIleGlnGln	CysGlyCysT	yrHisAsnGl	yValTyrTyr	GluProGluG	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AGACAGTCCT	CATTGACAAC	TGTGCCCAGC	AGTGCACTG	CCATGCGGGT	4850
lnThrValle	uIleAspAsn	CysArgGlnG	lnCysThrCy	sHisAlaGly	
AAAGGCATGG	TGTGCCAGGA	ACACAGCTGC	AAGCCGCGGC	AGGTGTGCCA	4900
LysGlyMetV	alCysGlnGl	uHisSerCys	LysProGlyG	lnValCysGl	
GCCCTCCGGA	GGCATCCTGA	GCTGCGTCAC	CAPAGACCCG	TGCCACGGCG	4950
nProSerGly	GlyIleLeuS	erCysValTh	rLysAspPro	CysHisGlyV	
TGACATGCCG	GCCACAGGAG	ACATGCAAGG	AGCAGGGTGG	CCAGGGCGTG	5000
alThrCysAr	gProGlnGlu	ThrCysLysG	luGlnGlyGl	yGlnGlyVal	
TGCCTGCCCA	ACTATGAGGC	CACGTGCTGG	CTGTGGGGCG	ACCCACACTA	5050
CysLeuProA	snTyrGluAl	aThrCysTrp	LeuTrpGlyA	spProHisTy	
CCACTCCTTC	GATGGCCGGA	AGTTTGACTT	CCAGGGCACC	TGTAACATATG	5100
rHisSerPhe	AspGlyArgL	ysPheAspPh	eGlnGlyThr	CysAsnTyrV	
TGCTGGCAAC	AACTGGCTGC	CCGGGGGTCA	GCACCCAGGG	CCTGACACCC	5150
alLeuAlaTh	rThrGlyCys	ProGlyValS	erThrGlnGl	yLeuThrPro	
TTCACCGTCA	CCACCAAGAA	CCAGAACCGG	GGCAACCCCTG	CTGTGTCCCTA	5200
PheThrValT	hrThrLysAs	nGlnAsnArg	GlyAsnProA	laValSerTy	
CGTGAGAGTC	GTCACCGTGG	CTGCCCTCGG	CACCAACATC	TCCATCCACA	5250
rValArgVal	ValThrValA	laAlaLeuGl	yThrAsnIle	SerIleHisL	
AGGACGAGAT	CGGCAAGTC	CGGGTGAACG	GTGTGCTCAC	AGCCTTGCCT	5300
ysAspGluIl	eGlyLysVal	ArgValAsnG	lyValLeuTh	rAlaLeuPro	
GTCTCTGTGG	CCGACGGGCG	GATTTCAGTG	ACCCAGGGTG	CATCGAAGGC	5350
ValSerValA	laAspGlyAr	gIleSerVal	ThrGlnGlyA	laSerLysAl	
ACTGCTGGTG	GCTGACTTTG	GACTGCAAGT	CAGCTATGAC	TGGAAGTGGC	5400
aLeuLeuVal	AlaAspPheG	lyLeuGlnVa	lSerTyrAsp	TrpAsnTrpA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGGTAGACGT	GACGCTGCCC	AGCAGCTATC	ATGGCGCAGT	GTGCGGGCTC	5450
rgValAspVa	lThrLeuPro	SerSerTyrH	isGlyAlaVa	lCysGlyLeu	
TGCGGTAAAC	TGGACCGCAA	CCCCAACAA	GACCAGGTCT	TCCCTAATGG	5500
CysGlyAsnM	etAspArgAs	nProAsnAsn	AspGlnValP	heProAsnGl	
CACACTGGCT	CCCTCCATAC	CCATCTGGGG	CGGCAGCTGG	CGAGCCCCAG	5550
yThrLeuAla	ProSerIleP	roIleTrpGl	yGlySerTrp	ArgAlaProG	
GCTGGGACCC	ACTGTGTTGG	GACGAATGTC	GGGGTCTCTG	CCCAACGTGC	5600
lyTrpAspPr	oLeuCysTrp	AspGluCysA	rgGlySerCy	sProThrCys	
CCTGAGGACC	GGTGGAGCA	GTACGAGGGC	CCTGGCTTCT	GCGGACCCCT	5650
ProGluAspA	rgLeuGluGl	nTyrGluGly	ProGlyPheC	ysGlyProLe	
GGCCCCCGGC	ACAGGGGGCC	CTTTCACCAC	CTGCCATGCT	CATGTGCCAC	5700
uAlaProGly	ThrGlyGlyP	roPheThrTh	rCysHisAla	HisValProP	
CTGAGAGCTT	CTTCAAGGGC	TGTGTTCTGG	ACGTCTGCAT	GGGTGGTGGG	5750
roGluSerPh	ePheLysGly	CysValLeuA	spValCysMe	tGlyGlyGly	
GACCGTGACA	TTCTTTGCAA	GGCTCTGGCT	TCCTATGTGG	CGGCCTGCCA	5800
AspArgAspI	leLeuCysLy	sAlaLeuAla	SerTyrValA	laAlaCysGl	
GGCTGCTGGG	GTTGTCATCG	AAGACTGGCG	GGCACAGGTT	GGCTGTGACA	5850
nAlaAlaGly	ValValIleG	luAspTrpAr	gAlaGlnVal	GlyCysGluI	
TCACCTGCCC	AGAAAACAGC	CACTATGAGG	TCTGTGGCCC	ACCCTGCCCC	5900
leThrCysPr	oGluAsnSer	HisTyrGluV	alCysGlyPr	oProCysPro	
GCCAGCTGTC	CGTCCCCTGC	ACCCCTTACG	ACGCCAGCCG	TATGTGAGGG	5950
AlaSerCysP	roSerProAl	aProLeuThr	ThrProAlaV	alCysGluGl	
CCCCGTGTGTG	GAGGGCTGCC	AGTGCGACGC	GGGTTTCGTG	TTAAGTCTG	6000
yProCysVal	GluGlyCysG	lnCysAspAl	aGlyPheVal	LeuSerAlaA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACCGCTGTGT	TCCCCTCAAC	AACGGCTGCG	GCTGCTGGGC	CAATGGCACC	6050
spArgCysVa	lProLeuAsn	AsnGlyCysG	lyCysTrpAl	aAsnGlyThr	
TACCACGAGG	CGGGCAGTGA	GTTTGGGGCT	GATGGCACCT	GCTCCCAGTG	6100
TyrHisGluA	laGlySerGl	uPheTrpAla	AspGlyThrC	ysSerGlnTr	
GTGTGGCTGC	GGGGCTGGGG	GTTGGCTGGCT	GGTCTGCACA	CCTGCCAGCT	6150
pCysArgCys	GlyProGlyG	lyGlySerLe	uValCysThr	ProAlaSerC	
GTGGGCTGGG	TGAAGTGTGT	GGCTCTCTGC	CATCCGGCCA	GCACGGCTGC	6200
ysGlyLeuGl	yGluValCys	GlyLeuLeuP	roSerGlyGl	nHisGlyCys	
CAGCCCGTCA	GCACAGCTGA	GTGCCAGGGG	TGGGGTGACC	CCCATTACGT	6250
GlnProValS	erThrAlaGl	uCysGlnAla	TrpGlyAspP	roHisTyrVa	
CACTCTGGAT	GGGCACCGAT	TCAATTTCOA	AGGCACCTGC	GAGTACCTGC	6300
lThrLeuAsp	GlyHisArgP	heAsnPheGl	nGlyThrCys	GluTyrLeuL	
TGAGTGACCC	CTGCCACGGA	CCACCCCTTG	GGGCTGAGAA	CTTCACTGTC	6350
euSerAlaPr	oCysHisGly	ProProLeuG	lyAlaGluAs	nPheThrVal	
ACTGTAGCCA	ATGAGCACCG	GGGCAGCCAG	GCTGTCAGCT	ACACCCGCAG	6400
ThrValAlaA	snGluHisAr	gGlySerGln	AlaValSerT	yrThrArgSe	
TGTCACCCCTG	CAAATCTACA	ACCACAGCCT	GACACTGAGT	GCCCCGCTGGC	6450
rValThrLeu	GlnIleTyrA	snHisSerLe	uThrLeuSer	AlaArgTrpP	
CCCCGAAGCT	ACAGGTGGAC	GGCGTGTTCG	TCACTCTGCC	CTTCCAGCTG	6500
roArgLysLe	uGlnValAsp	GlyValPheV	alThrLeuPr	oPheGlnLeu	
GACTCGCTCC	TGCACGCACA	CCTGAGCGGC	GCCGACGTGG	TGGTGACCAC	6550
AspSerLeuL	euHisAlaHi	sLeuSerGly	AlaAspValV	alValThrTh	
AACCTCAGGG	CTCTCGCTGG	CTTTCCAGCG	GCACAGCTTC	GTGCGCCTGC	6600
rThrSerGly	LeuSerLeuA	laPheAspGl	yAspSerPhe	ValArgLeuA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GCGTGGCGGC	GGCGTACGCG	GGCTCTCTCT	GTGGCTTATG	CGGGAAGTAC	6650
rgValProAl	aAlaTyrAla	GlySerLeuC	ysGlyLeuCy	sGlyAsnTyr	
AACCAGGACC	CCGCAGACGA	CCTGAAGGCG	GTGGGCGGGA	AGCCCCGCGG	6700
AsnGlnAspP	roAlaAspAs	pLeuLysAla	ValGlyGlyL	ysProAlaGl	
ATGGCAGGTG	GGCGGCGGCC	AGGGCTGCGG	GGAATGTGTG	TCCAAGCCAT	6750
yTrpGlnVal	GlyGlyAlaG	lnGlyCysGl	yGluCysVal	SerLysProC	
GCCCGTGGCC	GTGCACCCCA	GAGCAGCAAG	AGTCCTTCGG	CGGCCCCGAC	6800
ysProSerPr	cCysThrPro	GluGlnGlnG	luSerPheGl	yGlyProAsp	
GCCTGCGGCG	TGATCTCCGC	CACCGACGGC	CCGCTGGGCG	CCTGCCACGG	6850
AlaCysGlyV	alIleSerAl	aThrAspGly	ProLeuAlaP	roCysHisGl	
CCTTGTCGCG	CCCGCGCAGT	ACTTCCAGGG	CTGCTTGCTG	GACGCCTGCC	6900
yLeuValPro	ProAlaGlnT	yrPheGlnGl	yCysLeuLeu	AspAlaCysG	
AAGTTCAGGG	CCATCCTGGA	GGCCTCTGTC	CTGCAGTGGC	CACCTACGTC	6950
lnValGlnGl	yHisProGly	GlyLeuCysP	roAlaValAl	aThrTyrVal	
GCAGCCTGTC	AGGCGGCTGG	GGCCCAGCTC	CGCGAGTGGG	GGCGGCCGGA	7000
AlaAlaCysG	lnAlaAlaGl	yAlaGlnLeu	ArgGluTrpA	rgArgProAs	
CTTCTGTCCC	TTCCAGTGCC	CTGCCCCACAG	CCACTACGAG	CTCTGCGGTG	7050
pPheCysPro	PheGlnCysP	roAlaHisSe	rHisTyrGlu	LeuCysGlyA	
ACTCCTGTCC	TGGGAGCTGC	CCGAGCCTGT	CGGCACCCCA	GGGCTGTGAG	7100
spSerCysPr	oGlySerCys	ProSerLeuS	erAlaProGl	uGlyCysGlu	
TGGGCTGCC	GTGAGGCTG	TGTCTGCGAT	GCTGGCTTCG	TGCTCAGTGG	7150
SerAlaCysA	rgGluGlyCy	sValCysAsp	AlaGlyPheV	alLeuSerGl	
TGACACGTGT	GTACCTGTGG	GCCAGTGTGG	CTGCCTCCAC	GATGACCGCT	7200
yAspThrCys	ValProValG	lyGlnCysGl	yCysLeuHis	AspAspArgT	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACTACCCACT	GGGCCAGACC	TTCTACCCTG	GCCCTGGGTG	TGATTCCCTT	7250
yrTyrProLe	uGlyGlnThr	PheTyrProG	lyProGlyCy	sAspSerLeu	
TGCCGCTGCC	GGGAGGGGGG	TGAGGTGTCC	TGTGAGCCCT	CCAGCTGCGG	7300
CysArgCysA	rgGluGlyGl	yGluValSer	CysGluProS	erSerCysGl	
CCCCATGAG	ACCTGCCCGC	CATCCGGTGG	CAGCTTGGGC	TGCGTGGCCG	7350
yProHisGlu	ThrCysArgP	roSerGlyGl	ySerLeuGly	CysValAlaV	
TGGGCTCTAC	CACCTGCCAG	GCGTCGGGAG	ATCCCCACTA	CACCACCTTC	7400
alGlySerTh	rThrCysGln	AlaSerGlyA	spProHisTy	rThrThrPhe	
GATGGCCGCC	GCTTCGACTT	CATGGGCACC	TCCGTTATG	TGCTGGCTCA	7450
AspGlyArgA	rgPheAspPh	eMetGlyThr	CysValTyrV	alLeuAlaGl	
GACCTGCGGC	ACCCGGCCTG	GCCTACATCG	GTTTGGCGTC	CTGCAGGAGA	7500
nThrCysGly	ThrArgProG	lyLeuHisAr	gPheAlaVal	LeuGlnGluA	
ACGTGGCCTG	GGGTAATGGG	CGAGTCAGTG	TGACCAGGGT	GATCACGGTC	7550
snValAlaTr	pGlyAsnGly	ArgValSerV	alThrArgVa	lileThrVal	
CAGGTGGCAA	ACTTCACCTT	GCGGCTGGAG	CAGAGACAGT	GGAAGGTCAC	7600
GlnValAlaA	snPheThrLe	uArgLeuGlu	GlnArgGlnT	rpLysValTh	
GGTGAACGGT	GTGGACATGA	AGCTGCCCGT	GGTGCTGGCC	AACGGCCAGA	7650
rValAsnGly	ValAspMetL	ysLeuProVa	lValLeuAla	AsnGlyGlnI	
TCCGTGCCTC	CCAGCATGGT	TCAGATGTTG	TGATTGAGAC	CGACTTCGGC	7700
leArgAlaSe	rglnHisGly	SerAspValV	alileGluTh	rAspPheGly	
CTGCGTGTGG	CCTACGACCT	TGTGTACTAT	GTGCGGGTCA	CCGTCCCTGG	7750
LeuArgValA	laTyrAspLe	uValTyrTyr	ValArgValT	hrValProGl	
AACTACTAC	CAGCTGATGT	GTGGCCTGTG	TGGGAACCTAC	AACGGCCACC	7800
yAsnTyrTyr	GlnLeuMetC	ysGlyLeuCy	sGlyAsnTyr	AsnGlyAspP	



10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCAAGGATGA	CTTCCAGAAG	CCCAATGGCT	CGCAGCCAGG	CAACGCCAAT	7850
roLysAspAs	pPheGlnLys	ProAsnGlyS	erGlnAlaGl	yAsnAlaAsn	
GAGTTCGGCA	ACTCCTGGGA	GGAGGTGGTG	CCCGACTCTC	CCTGCCTGCC	7900
GluPheGlyA	snSerTrpGl	uGluValVal	ProAspSerP	roCysLeuPr	
GCGGCCCAAC	TGCCCCGGCG	GGAGCGAGGG	CTGTATCCCC	ACCGAGGAGT	7950
oProProThr	CysProProG	lySerGluGl	yCysIlePro	SerGluGluC	
GTCCTCCCGA	GCTGGAGAAG	AAGTATCAGA	AGCAGGAGTT	CTGTGGGCTC	8000
ysProProGl	uLeuGluLys	LysTyrGlnL	ysGluGluPh	eCysGlyLeu	
CTCTCCAGCC	CCACAGGGCC	ACTGTCTCTC	TGCCACACAGC	TGGTGGATCC	8050
LeuSerSerP	roThrGlyPr	oLeuSerSer	CysHisLysL	euValAspPr	
CCAGGGTCCC	TTGAAAGATT	GCACTTTTGA	TCTCTGGCTG	GGTGGTGGGA	8100
oGlnGlyPro	LeuLysAspC	ysIlePheAs	pLeuCysLeu	GlyGlyGlyA	
ACCTGAGCAT	TCTCTGCAGC	AACATCCATG	CCTACGTGAG	TGCTTGGCCAG	8150
snLeuSerIl	eLeuCysSer	AsnIleHisA	laTyrValSe	rAlaCysGln	
GCGGCTGGAG	GCCACGTGGA	GCCCTGGAGG	AATGAAACTT	TCTGTCCCAT	8200
AlaAlaGlyG	lyHisValGl	uProTrpArg	AsnGluThrP	heCysProMe	
GGAATGCCCT	CAGAACAGTC	ACTACGAGCT	CTGTGCGGAC	ACCTGCTCCC	8250
tGluCysPro	GlnAsnSerH	isTyrGluLe	uCysAlaAsp	ThrCysSerL	
TGGGCTGCTC	GCTCTCAGT	GCCCCCTCTG	AGTGCCCCAGA	TGGGTGTGCT	8300
euGlyCysSe	rAlaLeuSer	AlaProLeuG	lnCysProAs	pGlyCysAla	
GAGGCTGCC	AGTGTGACTC	CGGCTTCCTC	TACAACGGCC	AAGCCTGCGT	8350
GluGlyCysG	lnCysAspSe	rGlyPheLeu	TyrAsnGlyG	lnAlaCysVa	
CCCCATCCAG	CAATGTGGCT	GCTACCACAA	TGGTGCCCTAC	TATGATCCGG	8400
lProIleGln	GlnCysGlyC	ysTyrHisAs	nGlyAlaTyr	TyrGluProG	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACCAGACAGT	CCTCATTGAC	AACTGTCGGC	AGCA GTGCAC	GTGCCATGCC	8450
luGlnThrVa	lLeuIleAsp	AsnCysArgG	lnGlnCysTh	rCysHisAla	
GGTAAAGTCG	TGGTGTGCCA	GCPACACAGC	TGCAAGCCGG	GGCAGGTGTG	8500
GlyLysValV	alValCysGl	nGluHisSer	CysLysProG	lyGlnValCy	
CCAGCCCTCC	GTAGGCATCC	TGAGCTGCCG	CACCAAGAC	CCGTGCCACG	8550
sGlnProSer	GlyGlyIleL	euSerCysVa	lThrLysAsp	ProCysHisG	
GGGTGACATG	CCGCCACAG	GAGACATGCA	AGGAGCAGGG	TGGCCAGGGT	8600
lyValThrCy	sArgProGln	GluThrCysL	ysGluGlnGl	yGlyGlnGly	
GTGTGCCTGC	CCACTATGA	GGCCACGTGC	TGGCTGTGGG	GGACCCACA	8650
ValCysLeuP	roAsnTyrGl	uAlaThrCys	TrpLeuTrpG	lyAspProHi	
CTACCACTCC	TTCGATGGCC	GCAAGTTTGA	CTTCCAGGGC	ACCTGTAACT	8700
sTyrHisSer	PheAspGlyA	rgLysPheAs	pPheGlnGly	ThrCysAsnT	
ATGTGCTGCC	AACAAC TGCC	TGCCCCGGGG	TCAGCACCCA	GGGCCTGACA	8750
yrValLeuAl	aThrThrGly	CysProGlyV	alSerThrGl	nGlyLeuThr	
CCCTTCACCG	TCACCACCA	GPACCAGAAC	CGGGGCAACC	CTGCTGTATC	8800
ProPheThrV	alThrThrLy	sAsnGlnAsn	ArgGlyAsnP	roAlaValSe	
CTACGTGAGA	GTCGTACCG	TGGCTGCCCT	CGGCACCAAC	ATCTCCATCC	8850
rTyrValArg	ValValThrV	alAlaAlaLe	uGlyThrAsn	IleSerIleH	
ACAAGGACGA	GATCGCCAAA	GTCCGGGTGA	ACGGTGTGCT	CACAGCCTTG	8900
isLysAspGl	uIleGlyLys	ValArgValA	snGlyValLe	uThrAlaLeu	
CCTGTCTCCG	TGGCCGACGG	GCGGATTICA	GTGGCCACAG	GTGCATCGAA	8950
ProValSerV	alAlaAspGl	yArgIleSer	ValAlaGlnG	lyAlaSerLy	
GGCACTGCTG	GTGGCTGACT	TTGGACTGCA	AGTCAGCTAT	GACTGGA ACT	9000
sAlaLeuLeu	ValAlaAspP	heGlyLeuGl	nValSerTyr	AspTrpAsnT	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGGGGTAGA	CGTGACGCTC	CCCAGCAGCT	ATCATGGCGC	AGTGTGCGGG	9050
rpArgValAs	pValThrLeu	ProSerSerT	yrHisGlyAl	aValCysGly	
CTCTGGGGTA	ACATGGACCG	CAACCCCAAC	AATGACCAGG	TCTTCCCTAA	9100
LeuCysGlyA	snMetAspAr	gAsnProAsn	AsnAspGlnV	aPheProAs	
TGGCACACTG	GCTCCCTCCA	TACCCATCTG	GGGCGGCAGC	TGGCGAGCCC	9150
nGlyThrLeu	AlaProSerI	leProIleTr	pGlyGlySer	TrpArgAlaP	
CAGGCTGGGA	CCCACTGTGT	TGGACCAAT	GTGGGGGGTC	CTGCCCCACG	9200
roGlyTrpAs	pProLeuCys	TrpAspGluC	ysArgGlySe	rCysProThr	
TGCCCTGAGG	ACCGGTIGGA	GCAGTACGAG	GGCCCTGGCT	TCTGCGGACC	9250
CysProGluA	spArgLeuGl	uGlnTyrGlu	GlyProGlyP	heCysGlyPr	
CCTGGCCCCC	GGCACAGGGG	GGCCTTCAC	CACCTGCCAT	GCTCATGTGC	9300
oLeuAlaPro	GlyThrGlyG	lyProPheTh	rThrCysHis	AlaHisValP	
CACCTGAGAG	CTTCTTCAAG	GGCTGTGTTC	TGGACGTCTG	CATGGGTGGT	9350
roProGluSe	rPhePheLys	GlyCysValL	euAspValCy	sMetGlyGly	
GGGGACCATG	ACATTCTTTG	CAAGGCTCTG	GCTTCCTACG	TGGCCGCCTG	9400
GlyAspHisA	spIleLeuCy	sLysAlaLeu	AlaSerTyrV	aAlaAlaCy	
CCAGGCGGCT	GGGGTGTGCA	TGGAGACTG	GCGGGCACAG	GTTGGCTGTG	9450
sGlnAlaAla	GlyValValI	leGluAspTr	pArgAlaGln	ValGlyCysG	
AGATCACCTG	CCCAGAAAAC	AGCCACTATG	AGGTCTGTGG	CCCACCCTGC	9500
luIleThrCy	sProGluAsn	SerHisTyrG	luValCysGl	yProProCys	
CCGGCCAGCT	GTCCGTCCCC	TGCACCCCTT	ACGACGCCAG	CCGTATGTGA	9550
ProAlaSerC	ysProSerPr	oAlaProLeu	ThrThrProA	laValCysGl	
GGGCCCCCTG	GTGGAGGGCT	GCCAGTGCGA	CGCGGGTTTC	GTGTTAAGTG	9600
uGlyProCys	ValGluGlyC	ysGlnCysAs	pAlaGlyPhe	ValLeuSerA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTGACCGCTG	TGTTCCCTC	AACAACGGCT	GCGGCTGCTG	GGCCAATGCC	9650
laAspArgCy	sValProLeu	AsnAsnGlyC	ysGlyCysTr	pAlaAsnGly	
ACCTACCACG	AGCGGGCCAG	TGAGTTTGG	GCTGATGGCA	CCTGCTCCCA	9700
ThrTyrHisG	luAlaGlySe	rGluPheTrp	AlaAspGlyT	hrCysSerGl	
GTGGTGTGGC	TGCGGGCCTG	GGGGTGGCTC	GCTGGTCTGC	ACACCTGCCA	9750
nTrpCysArg	CysGlyProG	lyGlyGlySe	rLeuValCys	ThrProAlaS	
GCTGTGGGCT	GGTGAAATG	TGTGGCCTCC	TGCCATCCGG	CCAGCACGGC	9800
erCysGlyLe	uGlyGluVal	CysGlyLeuL	euProSerGl	yGlnHisGly	
TGCCAGCCCG	TCAGCACAGC	TGAGTGGCAG	GCGTGGGGTG	ACCCCCATTA	9850
CysGlnProV	alSerThrAl	aGluCysGln	AlaTrpGlyA	spProHisTy	
CGTCACTCTG	GATGGGCACC	GATTGCAATT	CCAAGGCACC	TGCGAGTACC	9900
rValThrLeu	AspGlyHisA	rgPheAspPh	eGlnGlyThr	CysGluTyrL	
TGCTGAGTGC	ACCCTGCCAC	GGACCACCTT	TGGGGGCTGA	GACTTCACT	9950
euLeuSerAl	aProCysHis	GlyProProL	euGlyAlaGl	uAsnPheThr	
GTCAGTGTAG	CCAATGAGCA	CCGGGGCAGC	CAGGCTGTCA	GCTACACCCG	10000
ValThrValA	laAsnGluHi	sArgGlySer	GlnAlaValS	erTyrThrAr	
CAGTGTACCC	CTGCAAATCT	ACAACCCACAG	CCTGACACTG	AGTGCCCGCT	10050
gSerValThr	LeuGlnIleT	yrAsnHisSe	rLeuThrLeu	SerAlaArgT	
GGCCCCGGGA	GCTACAGGTG	GACGGCGTGT	TCGTCACTCT	GCCCTTCCAG	10100
rpProArgLy	sLeuGlnVal	AspGlyValP	heValThrLe	uProPheGln	
CTGGACTCGC	TCCTGCACGC	ACACCTGAGC	GGCGCCGACG	TGGTGGTGAC	10150
LeuAspSerL	euLeuHisAl	aHisLeuSer	GlyAlaAspV	alValValTh	
CACAACCTCA	GGCTCTCGC	TGGCTTTTCA	CGGGGACAGC	TTCGTGCGCC	10200
rThrThrSer	GlyLeuSerL	euAlaPheAs	pGlyAspSer	PheValArgL	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGGCGGTGCC	GGCGGCGTAC	GCGGGCTCTC	TCTGTGGCTT	ATGCGGGAAC	10250
euArgValPr	oAlaAlaTyr	AlaGlySerL	euCysGlyLe	uCysGlyAsn	
TACAACCAGG	ACCCCGCAGA	CGACCTGAAG	GCGGTGGGCG	GGAAGCCCCG	10300
TyrAsnGlnA	spProAlaAs	pAspLeuLys	AlaValGlyG	lyLysProAl	
CGGATGGCAG	GTGGGCGGCG	CCCAGGGCTG	CGGGGAATGT	GTGTCCAAGC	10350
aGlyTyrGln	ValGlyGlyA	laGlnGlyCy	sGlyGluCys	ValSerLysP	
CATGCCCCGTC	GCGGTGCACC	CCAGAGCAGC	AAGAGTCCTT	CGGCGGGCCC	10400
roCysProSe	rProCysThr	ProGluGlnG	lnGluSerPh	eGlyGlyPro	
GACGGCTGCG	GCGTGATCTC	CGCCACCGAC	GCCCCGCTGG	CGCCCTGCCA	10450
AspAlaCysG	lyValIleSe	rAlaThrAsp	GlyProLeuA	laProCysHi	
CGGCTTGTG	CCGCCCCGCG	AGTACTTCCA	GCGCTGCTTG	CTGGACGCCT	10500
sGlyLeuVal	ProProAlaG	lnTyrPheGl	nGlyCysLeu	LeuAspAlaC	
GCCPAGTTCA	GGGCCATCCT	GGAGGCCTCT	GTCCTGCAGT	GCCCCCCTAC	10550
ysGlnValGl	nGlyHisPro	GlyGlyLeuC	ysProAlaVa	lAlaThrTyr	
GTGGCAGCCT	GTCAGGCGCG	TGGGGCCCCAG	CTCCGCGAGT	CGAGGCGGCG	10600
ValAlaAlaC	ysGlnAlaAl	aGlyAlaGln	LeuArgGluT	rpArgArgPr	
GGACTTCTGT	CCCTTCCAGT	GCCCTGCCCCA	CAGCCACTAC	GAGCTCTGCG	10650
oAspPheCys	ProPheGlnC	ysProAlaHi	sSerHisTyr	GluLeuCysG	
GTGACTCCTG	TCCTGGGAGC	TGCCCCAGCC	TGTGGGCACC	CGAGGGCTGT	10700
lyAspSerCy	sProGlySer	CysProSerL	euSerAlaPr	cGluGlyCys	
GAGTCGGCCT	GCGGTGAAGG	CTGTGTCTGC	GATGCTGGCT	TCGTGCTCAG	10750
GluSerAlaC	ysArgGluGl	yCysValCys	AspAlaGlyP	heValLeuSe	
TGGTGACACG	TGTGTACCTG	TGGGCCAGTG	TGGCTGCCTC	CACGATGACC	10800
rGlyAspThr	CysValProV	alGlyGlnCy	sGlyCysLeu	HisAspAspA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GCTACTACCC	ACTGGGCCAG	ACCTTCTACC	CTGGCCCTGG	GTGTGATTCC	10850
rgTyrTyrPr	oLeuGlyGln	ThrPheTyrP	roGlyProGl	yCysAspSer	
CTTTGCCGCT	GCCGGGAGGG	CGGTGAGGTG	TCCTGTGAGC	CCTCCAGCTG	10900
LeuCysArgC	ysArgGluGl	yGlyGluVal	SerCysGluP	roSerSerCy	
CGGCCCGCAT	GAGACCTGCC	GGCCATCCGG	TGSCAGCTTG	GGCTGCGTGG	10950
sGlyProHis	GluThrCysA	rgProSerGl	yGlySerLeu	GlyCysValA	
CCGTGGGCTC	TACCACCTGC	CAGCGGTGGG	GAGATCCCCA	CTACACCACC	11000
laValGlySe	rThrThrCys	GlnAlaSerG	lyAspProHi	sTyrThrThr	
TTGGATGGCC	GCCGCTTCCA	CTTCATGGGC	ACCTGGGTGT	ATGTGCTGGC	11050
PheAspGlyA	rgArgPheAs	pPheMetGly	ThrCysValT	yrValLeuAl	
TCAGACCTGC	GGCACCCGGC	CTGGCCTACA	TGGGTTTGCC	GTCTGTCAGG	11100
aGlnThrCys	GlyThrArgP	roGlyLeuHi	sArgPheAla	ValLeuGlnG	
AGAACGTGGC	CTGGGGTAAT	GGCGGAGTCA	GTGTGACCAG	GGTGATCAGG	11150
luAsnValAl	aTrpGlyAsn	GlyArgValS	erValThrAr	gValIleThr	
GTCCAGGTGG	CAAACTTCAC	CCTGCCGGCTG	GAGCAGAGAC	AGTGGPAGGT	11200
ValGlnValA	laAsnPheTh	rLeuArgLeu	GluGlnArgG	lnTrpLysVa	
CACGGTGAAC	GGTGTGGACA	TGAAGCTGCC	CGTGGTGCTG	GCCAACGGCC	11250
lThrValAsn	GlyValAspM	etLysLeuPr	oValValLeu	AlaAsnGlyG	
AGATCCGTGC	CTCCCAGCAT	GGTTCAGATG	TGTGATTGA	GACCGACTTC	11300
lnIleArgAl	aSerGlnHis	GlySerAspV	alValIleGl	uThrAspPhe	
GGCCTGCGTG	TGGCCTACGA	CCTTGTGTAC	TATGTGCGGG	TCACCGTCCC	11350
GlyLeuArgV	alAlaTyrAs	pLeuValTyr	TyrValArgV	alThrValPr	
TGGAACTAC	TACCAGCTCA	TGTGTGGCCT	GTGTGGGAAC	TACACCGGCG	11400
oGlyAsnTyr	TyrGlnLeuM	etCysGlyLe	uCysGlyAsn	TyrAsnGlyA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACCCCAAGGA	TGACTTCCAG	AAGCCCAATG	GCTCGCAGGC	AGGCAACGCC	11450
spProLysAs	pAspPheGln	LysProAsnG	lySerGlnAl	aGlyAsnAla	
AATGAGTTCG	GCAACTCCTG	GGAGGAGGTG	GTGCCCGACT	CTCCCTGCCT	11500
AsnGluPheG	lyAsnSerTr	pGluGluVal	ValProAspS	erProCysLe	
GCCGCCGCC	ACCTGCCCGC	CGGGGAGCGA	GGCTGTATC	CCCAGCGAGG	11550
uProProPro	ThrCysProP	roGlySerGl	uGlyCysIle	ProSerGluG	
AGTGTCTCC	CGAGCTGGAG	AAGAAGTATC	AGAAGGAGGA	GTCTGTGGG	11600
luCysProPr	cGluLeuGlu	LysLysTyrG	lnLysGluGl	uPheCysGly	
CTCCTCTCCA	GCCCCACAGG	GCCACTGTCC	TCTGCCACA	AGCTGGTGGA	11650
LeuLeuSerS	erProThrGl	yProLeuSer	SerCysHisL	ysLeuValAs	
TCCCCAGGGT	CCCTTGAAG	ATTGCATCTT	TGATCTCTGC	CTGGGTGGTG	11700
pProGlnGly	ProLeuLysA	spCysIlePh	eAspLeuCys	LeuGlyGlyG	
GGAACCTGAG	CATTCTCTGC	AGCAACATCC	ATGCCTACGT	GAGTGCTTGC	11750
lyAsnLeuSe	rIleLeuCys	SerAsnIleH	isAlaTyrVa	lSerAlaCys	
CAGCGGGCTG	GAGGCCACGT	GGAGCCCTGG	AGGAATGAAA	CTTTCTGTCC	11800
GlnAlaAlaG	lyGlyHisVa	lGluProTrp	ArgAsnGluT	hrPheCysPr	
CATGGAATGC	CCTCAGAACA	GTCACTACGA	GCTCTGTGCG	GACACCTGCT	11850
oMetGluCys	ProGlnAsnS	erHisTyrGl	uLeuCysAla	AspThrCysS	
CCCTGGGCTG	CTCGGCTCTC	AGTGCCCTTC	TGCAGTGCCC	AGATGGGTGT	11900
erLeuGlyCy	sSerAlaLeu	SerAlaProL	euGlnCysPr	oAspGlyCys	
GCTGAGGCT	GCCAGTGTA	CTCCGGCTTC	CTCTACACCG	GCCPAGCCTG	11950
AlaGluGlyC	ysGlnCysAs	pSerGlyPhe	LeuTyrAsnG	lyGlnAlaCy	
CGTGCCCATC	CAGCAATGTG	GCTGCTACCA	CAATGGTGTC	TACTATGAGC	12000
sValProIle	GlnGlnCysG	lyCysTyrHi	sAsnGlyVal	TyrTyrGluP	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CGGAGCAGAC	AGTCCTCATT	GACAACTGTC	GGCAGCAGTG	CACGTGCCAT	12050
rcGluGlnTh	rValLeuIle	AspAsnCysA	rgGlnGlnCy	sThrCysHis	
GTGGGTAAAG	TCGTGGTGTG	CCAGGACAC	AGCTGCAAGC	CGGGGCAGGT	12100
ValGlyLysV	alValValCy	sGlnGluHis	SerCysLysP	rcGlyGlnVa	
GTGCCAGCCC	TCCGGAGGCA	TCCTGAGGTG	CGTCAACAAA	GACCCGTGCC	12150
lCysGlnPro	SerGlyGlyI	leLeuSerCy	sValAsnLys	AspProCysH	
ACGGCGTGAC	ATGCCGGCCA	CAGGAGACAT	GCAAGGAGCA	GGGTGGCCAG	12200
isGlyValTh	rCysArgPro	GlnGluThrC	ysLysGluGl	nGlyGlyGln	
GGTGTGTGCC	TGCCCCACTA	TGAGGCCACG	TGCTGGCTGT	GGGGCGACCC	12250
GlyValCysL	euProAsnTy	rGluAlaThr	CysTrpLeuT	rpGlyAspPr	
ACACTACCAC	TCCTTCGATG	GCCGGAAGTT	TGACTTCCAG	GGCACCTGTA	12300
oHisTyrHis	SerPheAspG	lyArgLysPh	eAspPheGln	GlyThrCysA	
ACTATGTGCT	GGCAACAAC	GGCTGCCCGG	GGGTCAGCAC	CCAGGGCCTG	12350
snTyrValLe	uAlaThrThr	GlyCysProG	lyValSerTh	rGlnGlyLeu	
ACACCCCTTCA	CCGTCACCAC	CAAGPACCAG	AACCGGGGCA	ACCCTGCTGT	12400
ThrProPheT	hrValThrTh	rLysAsnGln	AsnArgGlyA	snProAlaVa	
ATCCTACGTG	AGAGTCGTCA	CCGTGGCTGC	CCTCGGCACC	AACATCTCCA	12450
lSerTyrVal	ArgValValT	hrValAlaAl	aLeuGlyThr	AsnIleSerI	
TCCACAGGA	CCAGATCGGC	AAAGTCCGGG	TGACCGGTGT	GCTCACAGCC	12500
leHisLysAs	pGluIleGly	LysValArgV	alAsnGlyVa	lLeuThrAla	
TTGGCTGTCT	CCGTGGCCGA	CGGGCGGATT	TCAGTGGCCC	AGGGTGCAATC	12550
LeuProValS	erValAlaAs	pGlyArgIle	SerValAlaG	lnGlyAlaSe	
GAAEGCACTG	CTGGTGGCTG	ACTTTGCACT	GCAAGTCAGC	TATGACTGGA	12600
rLysAlaLeu	LeuValAlaA	spPheGlyLe	uGlnValSer	TyrAspTrpA	



10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACTGGCGGGT	AGACGTGACG	CTCCCCAGCA	GCTATCATGG	CGCAGTGTGC	12650
snTrpArgVa	lAspValThr	LeuProSerS	erTyrHisGl	yAlaValCys	
GGGCTCTGCG	GTAACATGGA	CCGCAACCCC	AACAATGACC	AGGTCTTCCC	12700
GlyLeuCysG	lyAsnMetAs	pArgAsnPro	AsnAsnAspG	lnValPhePr	
TAATGGCACA	CTGGCTCCCT	CCATACCCCT	CTGGCGCGGC	AGCTGGCGAG	12750
oAsnGlyThr	LeuAlaProS	erIleProIl	eTrpGlyGly	SerTrpArgA	
CCCCAGGCTG	GGACCCACTG	TGTITGGGACG	AATGTGGGGG	GTCCTGCCCA	12800
laProGlyTr	pAspProLeu	CysTrpAspG	luCysArgGl	ySerCysPro	
ACGTGCCCTG	AGGACCGGTT	GGAGCAGTAC	GAGGGGCCCTG	GCTTCTGCGG	12850
ThrCysProG	luAspArgLe	uGluGlnTyr	GluGlyProG	lyPheCysGl	
ACCCCTGGCA	TCTGGCACAG	GGGGCCCCCTT	CACCACTGCG	CATGCTCATG	12900
yProLeuAla	SerGlyThrG	lyGlyProPh	eThrThrCys	HisAlaHisV	
TGCCACCTGA	GAGCTTCTTC	AAGGGCTGTG	TTCCTGGACGT	CTGCAITGGT	12950
alProProGl	uSerPhePhe	LysGlyCysV	alLeuAspVa	lCysMetGly	
GGTGGGGACC	ATGACATTCT	TTGCAAGGCT	CTGGCTTCCT	ACGTGGCCGC	13000
GlyGlyAspH	isAspIleLe	uCysLysAla	LeuAlaSerT	yrValAlaAl	
CTGCCAGGCC	GCTGGGGTTG	TCATCGAAGA	CTGGCGGCCA	CAGGTGGGCT	13050
aCysGlnAla	AlaGlyValV	alIleGluAs	pTrpArgAla	GlnValGlyC	
GTGAGATCAC	CTGCCCAGAA	AACACCCACT	ATGAGGTCTG	TGGCCCACCC	13100
ysGluIleTh	rCysProGlu	AsnSerHisT	yrGluValCy	sGlyProPro	
TGCCCCGGCA	GCTGTCCGTC	CCCTGCACCC	CTTACGACGC	CAGCCGTATG	13150
CysProAlaS	erCysProSe	rProAlaPro	LeuThrThrP	roAlaValCy	
TGAGGGCCCC	TGTGTGGAGG	GCTGCCAGTG	CGACGGGGGT	TTCGTGTTAA	13200
sGluGlyPro	CysValGluG	lyCysGlnCy	sAspAlaGly	PheValLeus	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GTGCTGACCG	CTGTGTTCCC	CTCAACAACG	GCTGCGGCTG	CTGGGCCAAT	13250
erAlaAspAr	gCysValPro	LeuAsnAsnG	lyCysGlyCy	sTrpAlaAsn	
GGCAGCTACC	ACGAGGGGGG	CAGTGAATTT	TGGGCTGATG	GCACCTGCTC	13300
GlyThrTyrH	isGluAlaGl	ySerGluPhe	TrpAlaAspG	lyThrCysSe	
CCAGTGGTGT	CGCTGCGGGC	CTGGGGGTGG	CTCGCTGGTC	TGCACACCTG	13350
rGlnTrpCys	ArgCysGlyP	roGlyGlyGl	ySerLeuVal	CysThrProA	
CCAGCTGTGG	GCTGGGTGAA	GTGTGTGGCC	TCCTGCCATC	CGGCCAGCAC	13400
laSerCysGl	yLeuGlyGlu	ValCysGlyL	euLeuProSe	rGlyGlnHis	
AGCTGCCAGC	CCGTCAGCAC	AGCTGAGTGC	CAGGCGTGGG	GTGACCCCCA	13450
SerCysGlnP	roValSerTh	zAlaGluCys	GlnAlaTrpG	lyAspProHi	
TTACGTCACT	CTGGATGGGC	ACCGATTCCA	TTTCCAAGGC	ACCTGCGAGT	13500
sTyrValThr	LeuAspGlyH	isArgPheAs	pPheGlnGly	ThrCysGluT	
ACCTGCTGAG	TGCACCTGCG	CACGGACCCAC	CCTTGGGGGC	TCAGAACTTC	13550
yrLeuLeuSe	rAlaProCys	HisGlyProP	roLeuGlyAl	aGluAsnPhe	
ACTGTCACTG	TAGCCAAATGA	GCACCGGGGC	AGCCAGGCTG	TCAGCTACAC	13600
ThrValThrV	alAlaAsnGl	uHisArgGly	SerGlnAlaV	alSerTyrTh	
CCGCAGTGTC	ACCGTGCAAA	TCTACAACCA	CAGCCTGACA	CTGAGTGCCC	13650
rArgSerVal	ThrLeuGlnI	leTyrAsnHi	sSerLeuThr	LeuSerAlaA	
GCTGGCCCCG	GAACTACAG	GTCCAGGGCG	TGTTCTGTGG	TCTGCCCTTTC	13700
rgTrpProAr	gLysLeuGln	ValAspGlyW	alPheValAl	aLeuProPhe	
CAGCTGGACT	CGCTCCTGCA	CGCACACCTG	AGCGGCGCCG	ACGTGGTGGT	13750
GlnLeuAspS	erLeuLeuHi	sAlaHisLeu	SerGlyAlaA	spValValVa	
GACCAACAACC	TCAGGGCTCT	CGCTGGCTTT	CGATGGGGAC	AGCTTCGTGC	13800
lThrThrThr	SerGlyLeuS	erLeuAlaPh	eAspGlyAsp	SerPheValA	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GCCTGCGCGT	GCCGCGCGCG	TACGCGGCTT	CTCTCTGTGG	CTTATGCGGG	13850
rgLeuArgVa	lProAlaAla	TyrAlaAlaS	erLeuCysGl	yLeuCysGly	
AACTACAACC	AGGACCCCGC	AGACGACCTG	AAGCTGTGTG	GCGGGAAGCC	13900
AsnTyrAsnG	lnAspProAl	aAspAspLeu	LysAlaValG	lyGlyLysPr	
CGCTGGATGG	CAGGTGGGCG	GGGCCCAGGG	CTGCGGGGAA	TGTGTGTCCA	13950
oAlaGlyTrp	GlnValGlyG	lyAlaGlnGl	yCysGlyGlu	CysValSerL	
AGCCATGCCC	GTGCGCGTGC	ACCCGAGAGC	AGCAGGAGTC	CTTCGGCGGC	14000
ysProCysPr	oSerProCys	ThrProGluG	lnGlnGluSe	rPheGlyGly	
CCGGACGCTT	GCGGCGTGAT	CTCCGCCACC	GACGCGCCGC	TGGCACCCCTG	14050
ProAspAlaC	ysGlyValIl	eSerAlaThr	AspGlyProL	euAlaProCy	
CCACGGCCTT	GTGCGGCCCC	CGCAGTACTT	CCAGGGCTGC	TTGCTGGACG	14100
sHisGlyLeu	ValProProA	laGlnTyrPh	eGlnGlyCys	LeuLeuAspA	
CCTGCCAAGT	TCAGGGCCAT	CCTGGAGGCC	TCTGTCTCTG	AGTGGCTACC	14150
laCysGlnVa	lGlnGlyHis	ProGlyGlyL	euCysProAl	aValAlaThr	
TACGTGGCAG	CCTGTCAGGC	CGCTGGGGCC	CAGCTCGGCG	AGTGGAGGCG	14200
TyrValAlaA	laCysGlnAl	aAlaGlyAla	GlnLeuGlyG	luTrpArgAr	
GCCGGACTION	TGTCCCTTGC	AGTGCCTCTG	CCACAGCCAC	TATGAGCTCT	14250
gProAspPhe	CysProLeuG	lnCysProAl	aHisSerHis	TyrGluLeuC	
GCGGTGACTC	CTGCCCCTGTG	AGCTGCCCGA	GCCTCTCAGC	ACCCGAGGGC	14300
ysGlyAspSe	rCysProVal	SerCysProS	erLeuSerAl	aProGluGly	
TGTGAGTCCG	CCTGCCGTGA	AGGCTGTGTC	TGCGATGCTG	GCTTCGTACT	14350
CysGluSerA	laCysArgGl	uGlyCysVal	CysAspAlaG	lyPheValLe	
CAGTGGTGAC	ACCTGCGTAC	CCGTGGGCCC	GTGTGGCTGC	CTCCATGATG	14400
uSerGlyAsp	ThrCysValP	roValGlyGl	nCysGlyCys	LeuHisAspG	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCCCGCTACTA	CCCACTGGGC	GAGGTCTTCT	ACCCGGGCCC	TCAGTGTGAG	14450
lyArgTyrTy	rProLeuGly	GluValPheT	yrProGlyPr	cGluCysGlu	
CGACGCTGTG	AGTGTGGGC	AGGTGGCCAT	GTCACCTGCC	AGCAGGGCCG	14500
ArgArgCysG	luCysGlyPr	cGlyGlyHis	ValThrCysG	lnGluGlyAl	
AGCCTGTGGG	CCCCATGAGG	AGTGCCGTT	AGAGGATGGT	GTCCAGGCCT	14550
aLaCysGly	ProHisGluG	luCysArgLe	uGluAspGly	ValGlnAlaC	
GTCATGCCAC	AGGCTGTGGC	CGCTGCCTGG	CCACGGGGG	CATCCACTAC	14600
ysHisAlaTh	rGlyCysGly	ArgCysLeuA	laAsnGlyGl	yIleHisTyr	
ATCACCCCTTG	ATGGCCGIGT	CTACGACCTG	CATGGCTCCT	GCTCCTATGT	14650
IleThrLeuA	spGlyArgVa	lTyrAspLeu	HisGlySerC	ysSerTyrVa	
CTTGGCCCAA	GTCTGCCACC	CAGAGCCTGG	GGACGAGGAC	TTTTCCATCG	14700
lLeuAlaGln	ValCysHisP	roLysProGl	yAspGluAsp	PheSerIleV	
TGCTTGAGAA	GAATGCAGCT	GGACATCTCC	AACGCCTCCT	GGTTACTGTG	14750
alLeuGluLy	sAsnAlaAla	GlyHisLeuG	lnArgLeuLe	uValThrVal	
GCTGGCCAGG	TTGTGAGCCT	AGCTCAGGGG	CAGCAGGTCA	CCGTGGACGG	14800
AlaGlyGlnV	alValSerLe	uAlaGlnGly	GlnGlnValT	hrValAspGl	
CGAGGCTGTG	GGCCTGCCTG	TGGGTGTGGG	CCGGTGGCG	GTGACCGCCG	14850
yGluAlaVal	AlaLeuProV	alAlaValGl	yArgValArg	ValThrAlaG	
AGGGCCGAAA	CATGGTTCTG	CAGACGACCA	AGGGGCTGCG	GCTTCTCTTT	14900
luGlyArgAs	nMetValLeu	GlnThrThrL	ysGlyLeuAr	gLeuLeuPhe	
GATGGCGATG	CCCACCTCCT	CATGTCCATC	CCCAGCCCT	TCCGTGGACG	14950
AspGlyAspA	laHisLeuLe	uMetSerIle	ProSerProP	heArgGlyAr	
GCTCTGTGGC	CTCTGTGGGA	ACTTCAATGG	CAACTGGAGT	GACCACTTTG	15000
gLeuCysGly	LeuCysGlyA	snPheAsnGl	yAsnTrpSer	AspAspPheV	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TCCTGCCCCA	TGGCTCAGCA	GCGTCCAGTG	TGGAGACCTT	CGGGGCTGCA	15050
alLeuProAs	nGlySerAla	AlaSerSerV	alGluThrPh	eGlyAlaAla	
TGCGGGGTGC	CCGGCTCCTC	CAAGGGCTGT	GGCGAGGGCT	CGGGGCCCCA	15100
TrpArgValP	roGlySerSe	rLysGlyCys	GlyGluGlyC	ysGlyProGl	
AGGCTGCCCC	GTGTGCTTGG	CAGAGGAGAC	TGCAACCTAT	GAGAGCAACG	15150
nGlyCysPro	ValCysLeuA	laGluGluTh	rAlaProTyr	GluSerAsnG	
AGGCCTGCGG	GCAGCTCCGG	AACCCCCAGG	GCCCCCTTCG	GACCTGCCAG	15200
luAlaCysGl	yGlnLeuArg	AsnProGlnG	lyProPheAl	aThrCysGln	
GCGGTGCTGA	GTCCCTCTGA	GTACTTCCGC	CAATGCGTAT	ACGACCTGTG	15250
AlaValLeuS	erProSerGl	uTyrPheArg	GlnCysValT	yrAspLeuCy	
CGCGCAAAG	GGTGACAAAG	CCTTCCTGTG	CCGCAGCCTG	GCAGCCTACA	15300
sAlaGlnLys	GlyAspLysA	laPheLeuCy	sArgSerLeu	AlaAlaTyrT	
CGGCGGCCTG	TCAGGCAGCT	GCGGTGGCCG	TGAGGCCCTG	GAGGACAGAC	15350
hrAlaAlaCy	sGlnAlaAla	GlyValAlaV	alLysProTr	pArgThrAsp	
AGCTTCTGCC	CGCTCCATTG	CCCCGCCCCA	AGCCACTACT	CCATCTGCAC	15400
SerPheCysP	roLeuHisCy	sProAlaHis	SerHisTyrS	erIleCysTh	
TGCGACCTGC	CAGGGATCCT	GTGCGGCTCT	CTCCGGCCTC	ACGGGCTGCA	15450
rArgThrCys	GlnGlySerC	ysAlaAlaLe	uSerGlyLeu	ThrGlyCyst	
CCACCCGCTG	TTTGTAGGGC	TGTGAGTGCG	ACGACCGCTT	CCTGCTTTCC	15500
hrThrArgCy	sPheGluGly	CysGluCysA	spAspArgPh	eLeuLeuSer	
CAGGGTGTCT	GCATCCCTGT	CCAGATTGT	GGCTGCACCC	ATAATGGCCG	15550
GlnGlyValC	ysIleProVa	lGlnAspCys	GlyCysThrH	isAsnGlyAr	
ATACTTGCCG	GTAAACTCCT	CCGTGCTGAC	CTCACTACTG	AGCGAGCGCT	15600
gTyrLeuPro	ValAsnSerS	erLeuLeuTh	rSerAspCys	SerGluArgC	

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GTTCCTGTTC	CTCAAGCTCT	GGCCTGACAT	GCCAGGCCCGC	TGGCTGCCCCA	15650
ysSerCysSe	rSerSerSer	GlyLeuThrC	ysGlnAlaAl	aGlyCysPro	
CCAGGCCGTG	TATGTGAGGT	CAAGGCTGAA	CCCCGGAACT	GCTGGGCCAC	15700
ProGlyArgV	alCysGluVa	lLysAlaGlu	AlaArgAsnC	ysTrpAlaTh	
CCGTGGTCTC	TGTGTCTGT	CTGTGGGTGC	CAACCTCACC	ACCTTTGATG	15750
rArgGlyLeu	CysValLeuS	erValGlyAl	aAsnLeuThr	ThrPheAspG	
GGGCCCCGTG	TGCCACCACC	TCTCCTGGTG	TCTATGAGCT	CTCTTCCCCG	15800
lyAlaArgGl	yAlaThrThr	SerProGlyV	alTyrGluLe	uSerSerArg	
TGCCCCAGGAC	TACAGAATAC	CATCCCCCTGG	TACCGTGTAG	TTGCCGAAGT	15850
CysProGlyL	euGlnAsnTh	rIleProTrp	TyrArgValV	alAlaGluVa	
CCAGATCTCC	CATGGCAAAA	CGGAGGCTGT	GGGCCAGGTC	CACATCTTCT	15900
lGlnIleCys	HisGlyLysT	hrGluAlaVa	lGlyGlnVal	HisIlePheP	
TCCAGGATGG	GATGGTGACG	TTGACTCCAA	ACAAGGGTGT	GTGGGTCAAT	15950
heGlnAspGl	yMetValThr	LeuThrProA	snLysGlyVa	lTrpValAsn	
GGTCTCCGAG	TGGATCTCCC	AGCTGAGAAG	TTACCATCTG	TGTCCGTGAG	16000
GlyLeuArgV	alAspLeuPr	oAlaGluLys	LeuAlaSerV	alSerValSe	
TGCTACACCT	GATGGCTCCC	TGCTAGTCCG	CCAGAAGGCA	GGGGTCCAGG	16050
rArgThrPro	AspGlySerL	euLeuValAr	gGlnLysAla	GlyValGlnV	
TGTGGCTTGG	AGCCAATGGG	AAGGTGGCTG	TGATTGTCAG	CPATGACCAT	16100
alTrpLeuGl	yAlaAsnGly	LysValAlaV	alIleValSe	rAsnAspHis	
GCTGGGAAAC	TGTGTGGGGC	CTGTGGAAAC	TTTGACGGGG	ACCAGACCAA	16150
AlaGlyLysL	euCysGlyAl	aCysGlyAsn	PheAspGlyA	spGlnThrAs	
TGATTGCCAT	CACTCCCAGG	AGAAGCCAGC	GATGCAGAAA	TGCAGACCGC	16200
nAspTrpHis	AspSerGlnG	luLysProAl	aMetGluLys	TrpArgAlaG	

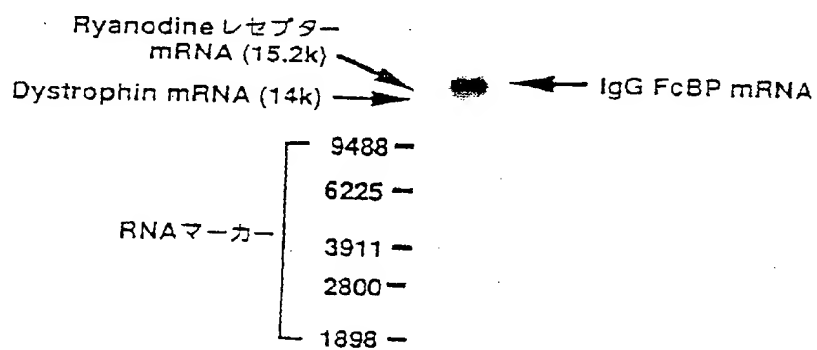
10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
AGGACTTCTC	CCCATGTTAT	GGCTGATCAG	TCATCCACCA	GGAACGAAGA	16250
lnAspPheSe	rProCysTyr	Gly			
TTTCCTGAAG	AAGACCTGGT	CCCTCTGGAG	GTTGCCGGTGG	CTGAAGGATG	16300
CATCATGTGC	TCTTACCCCTG	CTCTACCGGT	TTTCTGGGTC	ACAGAGGCCA	16350
AATGTGAGAG	CATTGAATAA	ATATCTTAAG	CT		16382

## 請求の範囲

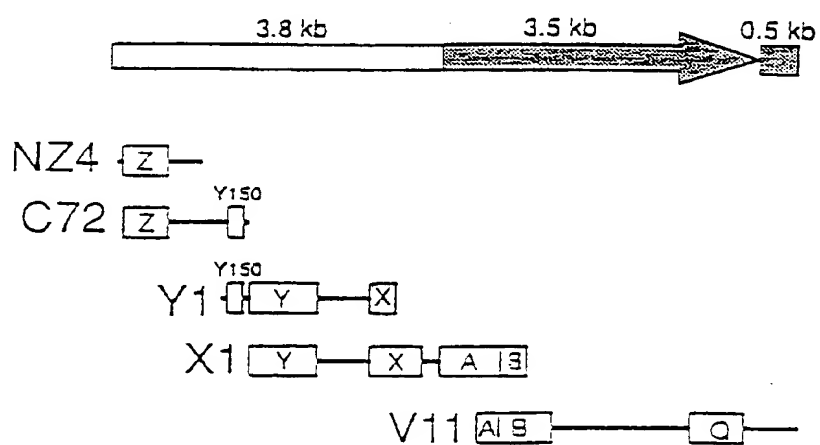
1. 配列表の配列番号6に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれを一部置換、欠失もしくは付加した塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含むDNAおよびそのDNA断片。
2. プラスミドpNV11-ST（生命研条寄第4625号：FERM BP  
5 -4625）中に挿入されている請求項1記載のDNAおよびそのDNA断片。
3. 配列表の配列番号7に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれを一部置換、欠失もしくは付加した塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含むDNAおよびそのDNA断片。
4. 請求項1または3記載のDNAまたはそのDNA断片を含有する組換えベ  
10 クター。
5. 請求項4記載の組換えベクターにより形質転換された原核または真核宿主細胞。
6. 請求項5記載の宿主細胞を培養し、産生されたタンパク質を分離、精製することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。
- 15 7. 組換えタンパク質がIgGFc部結合活性を示す請求項6記載の組換えタンパク質の製造方法。
8. 請求項5記載の宿主細胞を培養して得られる培養物を細胞内または細胞外から分離、精製して得られる組換えIgGFc部結合活性を示すタンパク質。
9. 請求項1または3記載のDNAまたはそのDNA断片をプローブとして用  
20 いて、ノーザンブロット解析またはインサイチュハイブリダイゼーション法によってIgGFc部結合タンパク質のmRNAの合成組織を同定する方法。



第 1 図



## 第 2 図



第 3 図

A



B.



C.

第 4 図

A.



B.



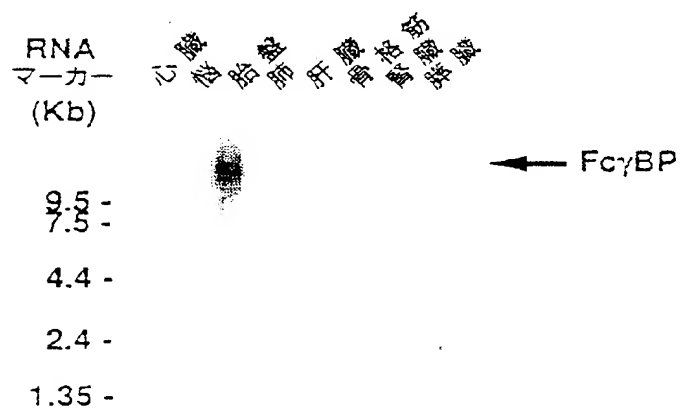
C.



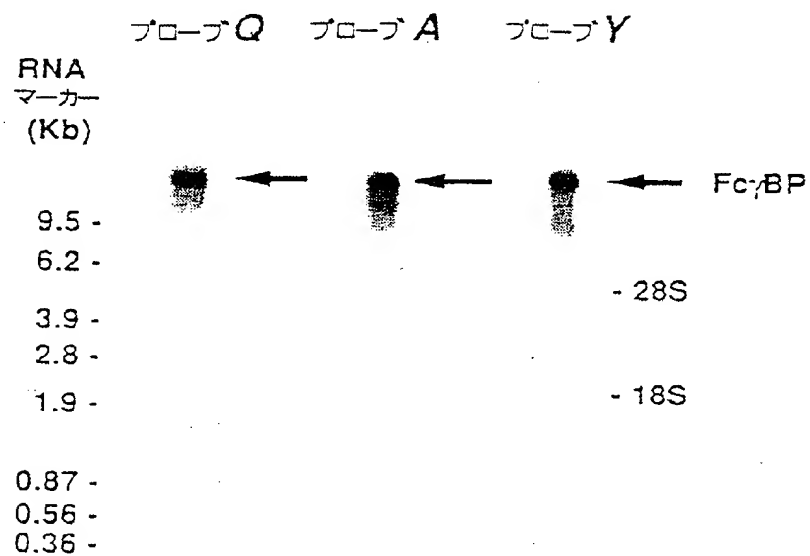
第 5 図



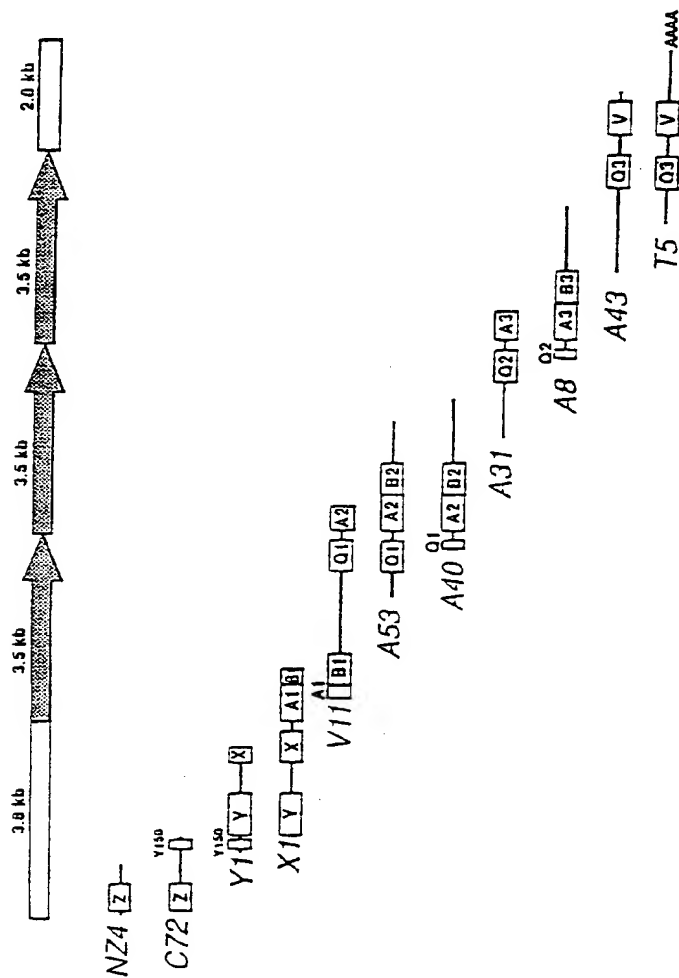
第 6 図



## 第 7 図



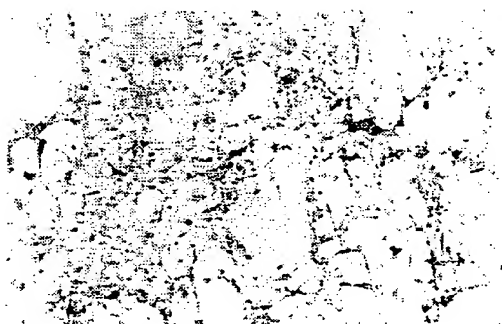
第 8 図



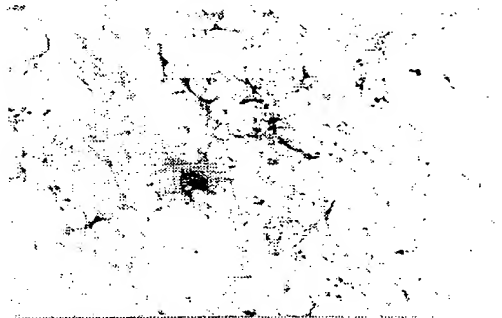


第 9 図

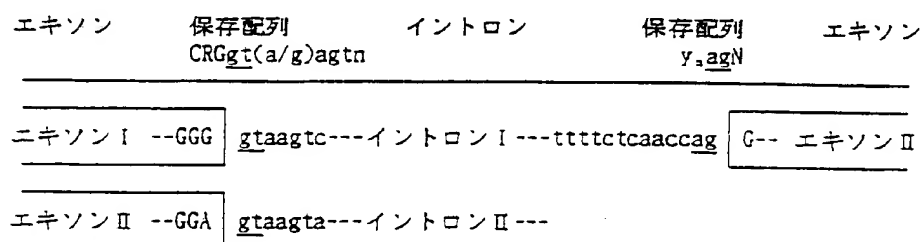
A.



B.



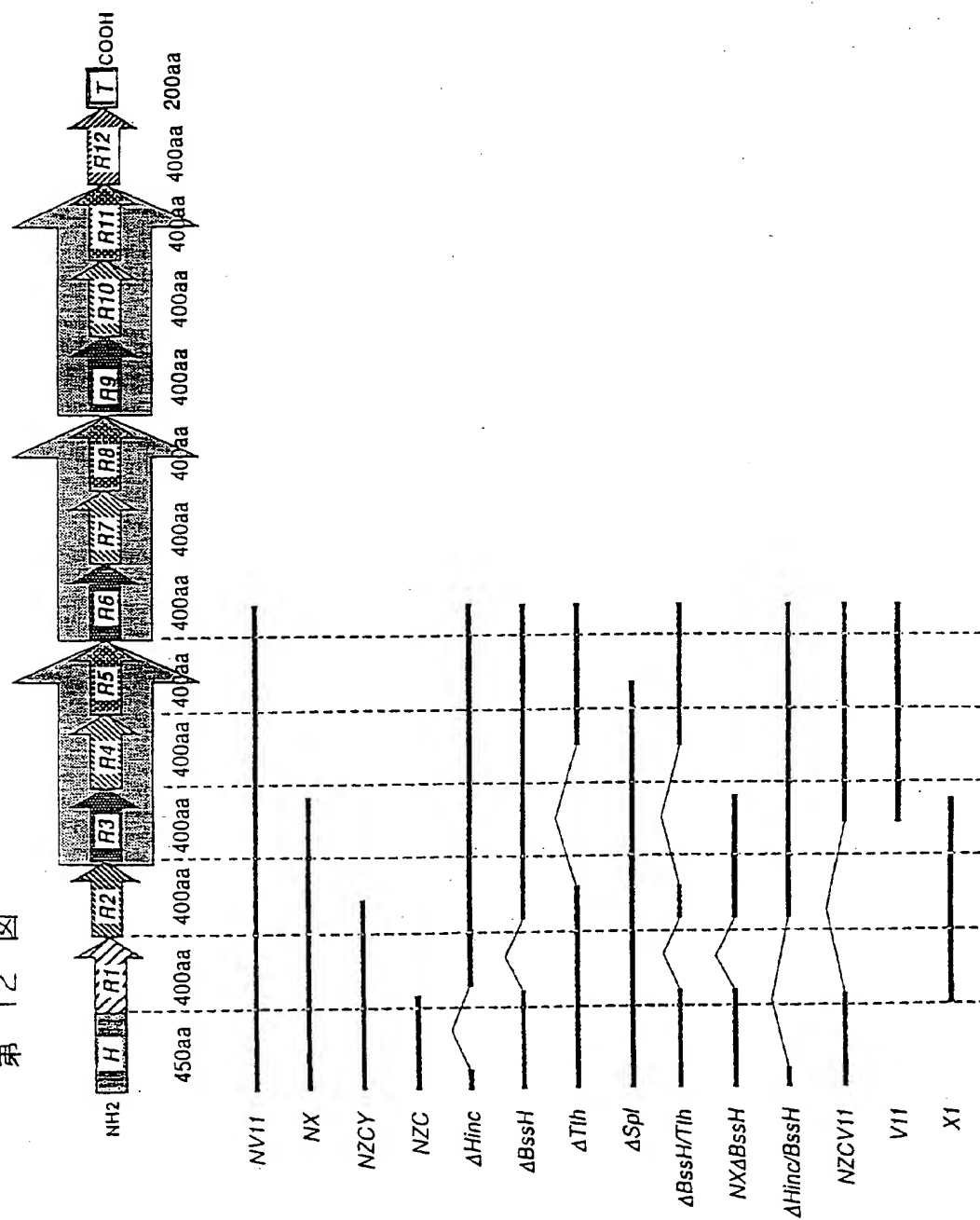
## 第 10 図



## 第 11 図

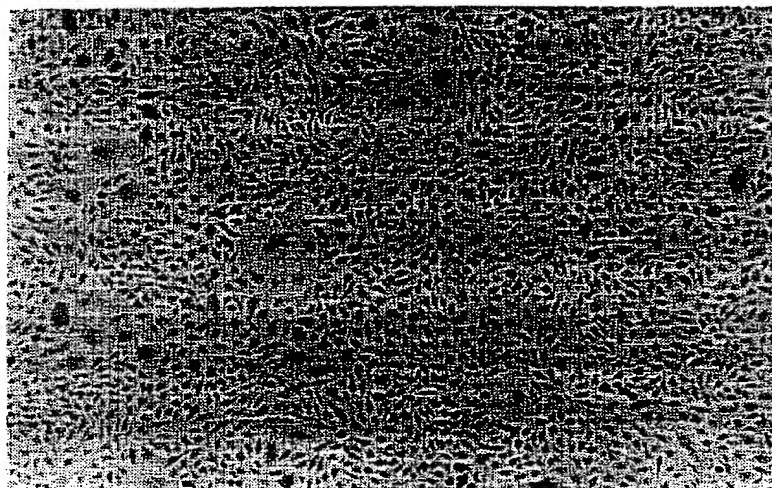
-----GGATCCATACCCCTGGCCCATCTCCCGACTTCTTTCCCACTCAGCCTTCAT  
 GGTCCAGGTGGCCCTTGTATGAGAGTGGCCCTTGTCCCAAGGACAGTCTCCAGCAGGCCGTGGA TCAGCCTTCTATGATCCTTTCTCTTTCTTA  
 CTGCAGCCATGGGTGCCCTATGGAGCTGGTGGATACCTTGGCTGGAGCAACCTCTCTGTGGGtaagtcagaccagaccctctccatgtccctgttcc  
 aatctgggaacctcgtgtggtccacgcttccatgtgtgctccctccacatgtcaccacaggttagctgagacagagagagggcccttaggcctgtgca  
 ggagga tgggtagaattc-----Xbb-----  
 -----tgctggcccatcagcatggagtttgagggccctgtc taagggttttagatttttgaanaac  
 aaaaagccaggaaggctttagacgaaggctgcatgaa tcagaagaaggaagagaagggtggtggggaagcccaagttatattcaacatgtttct  
 gggtagagagcaaaagtgggaggattgga taagtggaccacacatgtat ttttcacaccagGATTGACCCAGGAGGCTTCAGTGGACCTCAAGAACAC  
 101  
 TGGCAGAGGGAATTCTCTACAGCCTTCTGCAGAACTATCAGCTGGCTACAGCAAGGCTTCCCCGCTCTTATCTCCAGTCTGTACAGAGCCCC  
 201  
 GCTTCAGTCTCCATCTCTCAGCCAGGCAGACAACCTCAAGAAGGTCAAGTGAAGGCCGGGAGTCTGCTATGCTCAGTCTGCAAGGCTGAGA  
 301  
 TGATAGGCAGCAAGATCTTCCAGCATGGCGTGGTGA TCCATTCTGACTATGCCATCTCTGTGCAAGCAGTAAATGCCAAGCCTGACACAGCGGAGTGA  
 401  
 ACTGCTGCGGCCATCCAGGCCCTAGGCACCGAGTATTTGTGCTCACACCCCTGGCACTCAGCCAGGAATGTCAAGGATTTGCCGTGGTGGCGGT  
 501  
 GCGCAGGTGCTCTGCTCAGTGTCAAGCTGAAGGGGTCACTGACATTCAT TGGCAAGTCTATCCAGCAGCGATGCTCTAAGAGTGAATCTACAGCCCT  
 601  
 ACAATGTGCCCAAGCTACAGAGCTCAGTGGATCTCTCGGGTCAAGGTACAGCTAGTAGCCCCCTGGCTGTCTCTCTGCCCCACAGCTGTGGCAGAA  
 701  
 ACATACGACCTGCAACCATGTGGTGGAGCAGCTGCTACCCAGTCTGGCTGGGCCACCCACTATGTAGTACCCAGCTGGCTCCCAATCTCGCTATGAT  
 801  
 TTGGCCTTCGTTGTGGCCAGCCAGGCCACAAAGGTGAAGCTACACCATGGGGTATCACTGGCTCCCGTGGCTCCAGGCAGGTGATGTGGTAGAGTTG  
 901  
 AGGTCCGGCATCTCTGCCCCACTCTACCTGTCTGCAAAATGTGGCATCCAGGTCTGTGTTTGGCA CAGTGCCTAAGGAATGAAGTGAATTAAGCCC  
 1001  
 CTACCTGGTCTGTATCCAGATGTGGCGGCTACTGCCAGCCTATGTGGTCAAGAGTGTACCAAGCTGTGAGGGCGTGGCCCTGGTAGTGGCAGAGCG  
 1101  
 AAGGCTATCAGCGGCTGACCATAGATGGGCA TGCAGTGGGGCCAGGCTCACCTGGGAGGCTGTGCCAGGCAAGTGTCTGCTATGCTGAAGTGGAGC  
 1201  
 TCGGCACAGCTGACATGA TCCACAGGCCGAGGCCACCACTTGGGCTGCTCACCTTGGGCTGGCCAGGCTATAGGCTACGCAACAGCTGCTGA  
 1301  
 TTGGGCGCCGAgtaagtaaggaaa tgtcccttggtccctgtgacacgttttccaccacc tacctctgtggttttcgga tccctgatgt  
 tccctccctccatctctctcccgacatccctcccaagttctccagccctccca tccgcccagaacaa tttctaaa ttttagcaaccaggga  
 gagctggggcac taccagtcagaagagacagcagccaaagcac tggacagggtcc tgaagcccca tca tgc tggca tccagccctgtctgtgtgtgt  
 ttttggaagggtccc-----

第 12 図

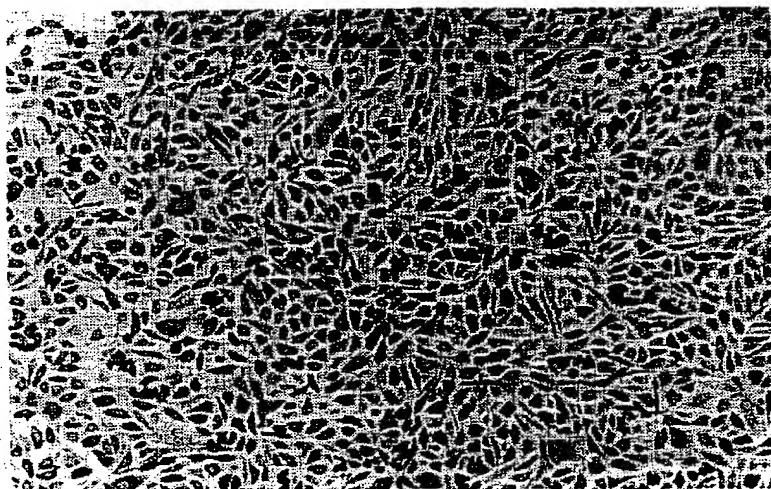


第 13 図

A



B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00638

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl <sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68// (C12P21/02, C12R1:91) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl <sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68// (C12P21/02, C12R1:91) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Immunology, Vol. 146, No. 1 (1991), K. Kobayashi, et al. "the molecular configuration and ultrastructural locations of an IgG Fc binding site in human colonic epithelium" p. 68-74	1 - 9
A	Journal of Immunology, Vol. 143, No. 8 (1989), K. Kobayashi, et al. "Identification of a unique IgG Fc binding site in human intestinal epithelium" p. 2567-74	1 - 9
A	Digestive Diseases and Sciences, Vol. 39, No. 3 (1994. Mar) K. Kobayashi, et al. "Study of colonic IgG Fc binding site in cultured epithelial cells" p. 526-33	1 - 9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search June 12, 1995 (12. 06. 95)		Date of mailing of the international search report July 4, 1995 (04. 07. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68 // (C12P21/02, C12B1:91)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/735, C12Q1/68 // (C12P21/02, C12B1:91)		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Immunology, 第146巻, 第1号 (1991), K. Kobayashi, et al. 「The molecular configuration and ultrastructural locations of an IgG Fc binding site in human colonic epithelium」 p.68-74	1-9
A	Journal of Immunology, 第143巻, 第8号 (1989), K. Kobayashi, et al. 「Identification of a unique IgG Fc binding site in human	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
12.06.95		04.07.95
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高 堀 栄 二 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>intestinal epithelium] p.2567-74</p> <p>Digestive Diseases and Sciences, 第39巻, 第3号(1994. Mar) K. Kobayashi, et al. 「Study of colonic IgG Fc binding site in cultured epithelial cells」 p.526-33</p>	1-9